



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 322 116**

② Número de solicitud: 200700644

⑤ Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **12.03.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2009**

Fecha de la concesión: **12.03.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **29.03.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
29.03.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Fernández Herrero, Luis Ángel y
Blanco Toribio, Ana**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Microorganismo productor de anticuerpos, elementos necesarios para su obtención, anticuerpos así producidos, composiciones terapéuticas y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Microorganismo productor de anticuerpos, elementos necesarios para su obtención, anticuerpos así producidos, composiciones terapéuticas y sus aplicaciones.

La presente invención describe un microorganismo productor, secretor e inyector de anticuerpos recombinantes monodominio en células eucariotas, animales o plantas, gracias a la presencia de una construcción genética que contiene una señal de secreción de tipo III. Además, estos microorganismos no patógenos o atenuados pueden utilizarse en la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas o veterinarias.

ES 2 322 116 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Microorganismo productor de anticuerpos, elementos necesarios para su obtención, anticuerpos así producidos, composiciones terapéuticas y sus aplicaciones.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se enmarca en el campo de la biotecnología, más concretamente en el campo de producción de anticuerpos, microorganismos productores de anticuerpos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas o veterinarias.

10 **Estado de la técnica**

La posibilidad de expresar y seleccionar moléculas de anticuerpo en bacterias, especialmente en *Escherichia coli* y sus bacteriófagos ha atraído la atención de la biotecnología en las últimas décadas^{1,2} y ha aumentado enormemente el potencial biotecnológico de los anticuerpos para su utilización en procesos de diagnóstico y terapia frente a múltiples enfermedades, como el cáncer o enfermedades autoinmunes^{3,4}. Los denominados anticuerpos recombinantes, producidos en bacterias por técnicas de ingeniería genética, son pequeños fragmentos derivados de las moléculas completas de anticuerpo (e.g. IgGs) que mantienen la capacidad de unión al antígeno^{1,5}. Estos fragmentos de anticuerpos conservan
20 y en ocasiones tienen además algún(os) dominios constantes (C) donde residen otras funciones de los anticuerpos (p.ej. activación del complemento). Así, aunque existen múltiples formatos de anticuerpos recombinantes, todos ellos tienen como unidad mínima común un dominio V con capacidad de unión al antígeno. De esta manera, y basándonos sólo en criterios estructurales, los anticuerpos recombinantes pueden ser clasificados al menos en tres tipos básicos: anticuerpos monodominio (*domain antibodies*, *dAbs*; si sólo contienen un dominio V)⁶, monocadena Fv (o *single chain Fv*, *scFv*; si contienen los dominios V de las cadenas pesada -VH- y ligera -VL- conectados a través de un pequeño péptido flexible) y fragmentos Fab (*antigen binding fragment*, *Fab*, formados por dos cadenas polipeptídicas, una conteniendo los dominios VH-CH1 y la otra los dominios VL-CL. Posteriormente, mediante combinaciones de dos, tres o cuatro (o más) de estas unidades básicas, ya sean *dAbs*, *scFvs*, o *Fabs*, se obtienen los diabodies, triabodies o tetrabodies, que
30 son moléculas de mayor afinidad (avidez) por el antígeno por disponer de repeticiones del sitio de unión¹. Además, si se adicionan distintos dominios C a estas moléculas, se puede obtener toda una diversidad de moléculas de anticuerpos recombinantes conocidas colectivamente como minibodies⁷. En todos los casos, como se ha explicado antes, los distintos formatos de anticuerpos recombinantes siempre tienen como unidad común básica al menos un dominio V con capacidad de unión a un antígeno determinado.

Estos *domain antibodies* *dAb*⁴ mantienen la capacidad de unión a antígeno y son dominios V que derivan tanto de anticuerpos naturales “estándar” (con cadenas pesadas y ligeras, como los encontrados en el hombre, el ratón, o el conejo) como de anticuerpos naturales con únicamente cadenas pesadas (o *heavy chain antibodies*), como los producidos por la familia de los camélidos (e.g. camellos, llamas y vicuñas)⁶ o los dominios IgNAR de escaulos (p. ej. tiburones nodriza)¹¹. Así, los *dAbs* pueden ser dominios V de cadenas ligeras (VL) o dominios V de cadenas pesadas (VH), ya sean de anticuerpos estándar o de anticuerpos de sólo cadenas pesadas (VHH, *heavy chain only* VH). El pequeño tamaño de estos anticuerpos recombinantes *dAb*, su escasa inmunogenicidad y rechazo en humanos, su facilidad de expresión en bacterias y levaduras a altas concentraciones, y su características bioquímicas de estabilidad a agentes desnaturalizantes y solubilidad, han suscitado el interés de la comunidad científica y del sector biotecnológico y farmacéutico^{4,12}. De hecho, diversas empresas han centrado su actividad exclusivamente en las aplicaciones biotecnológicas de los *dAb*, como por ejemplo Domantis (<http://www.domantis.com/>) o Ablynx (<http://www.ablynx.com/>) y tienen patentes exclusivas sobre los *dAbs*.

Por otro lado, existen sistemas de inyección de proteínas desde una bacteria a una célula eucariótica, como por ejemplo los sistemas de secreción de proteínas tipo III (SST3). Los SST3 son responsables de la inyección al citoplasma de una célula eucariótica de determinadas proteínas bacterianas que participan en el desarrollo de la infección^{15,16}. Las proteínas naturales inyectadas por los sistemas SST3, también llamadas *proteínas efectoras*, suelen ser toxinas que alteran el metabolismo de la célula eucariótica. Existen SST3 homólogos a los de *E. coli* EPEC y EHEC empleados en esta invención en múltiples cepas de bacterias Gram negativas patógenas de animales (p.ej. *Salmonella enterica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexnerii*, *Citrobacter rodentium*) y de plantas (*Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, etc.). Los SST3 son sistemas complejos y están constituidos por más de 20 proteínas distintas que ensamblan una superestructura molecular conocida como complejo de aguja (*needle complex*) o inyectisoma (*injectisome*) que atraviesa las membranas interna y externa de las bacterias gram negativas formando una estructura en forma de jeringa especializada en la secreción e inyección de proteínas^{15,16}. En las cepas EPEC y EHEC los componentes más destacables del complejo de la aguja son la proteína EscF, la proteína EscC -que forma un canal hidrófilo en la membrana externa bacteriana- y la proteína EscN, que es una ATPasa esencial para el proceso de secreción localizada en la base de la aguja¹⁷. Otros componentes estructurales de la aguja en EPEC y EHEC son los productos de los genes *escR* *escS* *escT* *escU* *escD* *escJ* *escV* y *sepQ*, entre otros. Además del complejo de la aguja, la inyección de proteínas a la célula eucariótica por la maquinaria SST3 precisa de un grupo de proteínas llamadas “translocadoras” (*translocators*) que forman un canal en la membrana plasmática de la célula eucariótica. Estas proteínas translocadoras suelen ser secretadas por los propios SST3^{15,16}. De acuerdo con este modelo, se ha observado que cepas mutantes en las proteínas translocadoras son capaces de secretar los efectores al medio pero no de inyectarlos a la célula eucariótica. En las cepas EPEC y EHEC

las proteínas translocadoras son EspB y EspD. Además, en los SST3 de EPEC y EHEC, la proteína EspA (también translocada por el SST3) forma un filamento que se extiende más allá de la aguja (EscF) hasta el poro de translocación formado por EspB/D¹⁷.

5 Los componentes de los SST3 se ensamblan de manera secuencial^{15,16}, así las primeras en ensamblarse son los anillos que se encuentran en las membranas interna y externa de la bacteria (EscV y EscC, interior y exterior respectivamente), entre estas dos proteínas una tercera actúa de puente (EscJ), de manera que la proteína que atraviesa el sistema no tenga ningún contacto con el espacio periplásmico. A continuación, se ensamblan las proteínas de la aguja (EscF), los filamentos de EspA y, finalmente, las proteínas translocadoras EspD y EspB^{17,18}.

10 Los SST3 se han empleado con anterioridad a esta invención dentro del campo de la generación de vacunas vivas basadas en cepas bacterianas atenuadas. Así, se han inyectado distintos antígenos (bacterianos, virales o tumorales) desde cepas atenuadas bacterianas (derivadas de *Salmonella enterica* o *Yersinia enterocolitica*) para que indujesen una respuesta inmune en el hospedador frente al antígeno/s inyectados¹⁹⁻²⁷. Por ejemplo, se han empleado cepas atenuadas de *Salmonella enterica* para la inyección de antígeno Gag del virus HIV-1²⁸ o el antígeno tumoral NY-ESO-1²⁹.

Las cepas EPEC y EHEC empleadas en esta invención, son enteropatógenos que desarrollan la infección a través de una unión fuerte a las células del epitelio intestinal (enterocitos) llamada lesión de adhesión y barrido (*attaching and effacing A/E lesion*)¹⁸. La capacidad de unión íntima a la membrana plasmática del enterocito está mediada por una adhesina bacteriana llamada Intimina (*eaeA*), localizada en la membrana externa de la bacteria, que interacciona con un receptor llamado Tir (*translocated intimin receptor*) localizado en la membrana plasmática de la célula epitelial y que la propia bacteria inyecta a través del SST3¹⁷. Gracias a las uniones Intimina-Tir se facilita la labor del SST3 de inyección de efectores de las cepas EPEC y EHEC hacia el citoplasma de la célula epitelial. Los efectores de las cepas EPEC y EHEC (por. ej. EspF, Map, EspG, EspH, EspZ, TccP/EspF_U, EspJ, Cif) participan en el proceso de patógenosis provocando entre otras cosas una desorganización del citoesqueleto lo que provoca una desaparición de las microvellosidades del enterocito¹⁷.

En las cepas EPEC y EHEC los genes que codifican a los componentes estructurales de la aguja, el poro de translocación, la proteínas intimina (*eaeA*) y Tir, así como la mayoría de los efectores del SST3, se localizan en un locus genético llamado LEE (*locus of enterocyte effacement*) de 35 kb. Es destacable que la transferencia de este locus a otras cepas de *E. coli* no patógenas (como la K-12) hace que estas últimas generen lesiones de adhesión y barrido (A/E) en el enterocito³⁰, lo que indica que el SST3 puede ser funcional en cepas no patógenas de *E. coli* (como K-12).

La maquinaria de los SST3 reconoce señales presentes en la secuencia de las proteínas efectoras, o en los mRNAs que las codifican, que se denominan genéricamente secuencias señal tipo III (SS). Estas SS sólo están bien definidas y caracterizadas de forma empírica en algunas de las proteínas efectoras de los SST3^{15,16}. Generalmente las SS suelen estar localizadas próximas al extremo N-terminal de las proteínas efectoras, y están constituidas por los primeros 15-30 aminoácidos de la proteína efectora, o en los primeros 15-30 codones de su mRNA. Como norma general las SS no muestran un consenso o motivo común identificable para todas ellas. Las SS de los SST3 no se proteolizan después de la secreción, como ocurre con otras secuencias señalizadoras de la exportación de proteínas. Además de las SS, algunas proteínas efectoras dependen de su interacción con chaperonas específicas de SST3 para su secreción¹⁵, denominadas chaperonas de clase I (p. ej. en EPEC y EHEC, las chaperonas CesT y CesF que contribuyen a la secreción de Map/Tir y EspF, respectivamente. CesT es también la chaperona de EscF, EscJ, EscC, que son componentes estructurales de la aguja). Sin embargo, es de remarcar que aunque una proteína efectora puede depender de una chaperona de clase I para su secreción por el SST3, la secreción de determinadas proteínas de fusión de las SS N-terminales de 15-30 aminoácidos con proteínas heterólogas (p.ej. β -lactamasa) no dependen de estas chaperonas^{15,16,31}. En las proteínas efectoras naturales, los dominios de unión de las chaperonas de clase I se localizan inmediatamente posteriores a las SS N-terminales y suelen ser regiones de aproximadamente 50-100 aminoácidos. Existen otras dos clases de chaperonas de SST3 (II y III) de acuerdo a homologías estructurales y que participa en la estabilización y secreción de las diferentes proteínas secretadas. Las chaperonas de clase II participan en la estabilización de las proteínas translocadoras (p.ej. CesD es la chaperona de EspB y EspD en EPEC y EHEC). Las chaperonas de la clase III participan en la secreción de algunos componentes estructurales de la aguja (p.ej. En EHEC y EPEC, CesA es la chaperona de EspA).

Finalmente, tal como se ha comentado anteriormente la utilización de anticuerpos terapéuticos se ha restringido hasta la fecha mayoritariamente a su administración artificial como moléculas puras, por lo que la disposición de otras vías de administración más naturales o dirigidas puede incrementar la capacidad de uso terapéutico de los anticuerpos.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un microorganismo con un sistema de inyección de proteínas tipo III (SST3) útil para la secreción extracelular o inyección de anticuerpos funcionalmente activos en células eucariotas, en adelante microorganismo SST3 de la presente invención, que presenta una construcción genética SST3-Ab que comprende, al menos, una secuencia de ADN que contiene la secuencia codificante de la región señal de secreción (SS) reconocida por el sistema SST3 unida o fusionada a una secuencia de ADN que contiene la secuencia codificante de un anticuerpo y que permite la expresión de dicho anticuerpo de fusión funcionalmente activo en su citoplasma y su secreción o inyección exterior.

ES 2 322 116 B1

Otro objeto de la presente invención lo constituye la construcción genética SST3-Ab, en adelante construcción genética SST3-Ab de la invención, que comprende, al menos:

- i) una secuencia de ADN codificante de una señal de secreción de tipo III, y
- ii) una secuencia de ADN codificante de un anticuerpo de interés.

Otro objeto particular de la invención lo constituye la construcción genética SST3-Ab de la invención donde la secuencia de ADN codificante de una señal de secreción de tipo III (SS) es la secuencia SS de *E. coli*, preferentemente un fragmento de la misma, y más preferentemente la SEC ID NO5 que codifica los primeros 20 aminoácidos N-terminales de EspF (EspF20), donde se encuentra la señal de secreción tipo III de su efector.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un vector de expresión génica, en adelante vector de expresión SST3-Ab, que contiene la construcción genética SST3-Ab de la presente invención y que permite la expresión de dicha construcción en el citoplasma del microorganismo de la invención.

Otro objeto de la invención lo constituye el anticuerpo de fusión SST3-AB obtenido mediante la expresión de la construcción genética o a partir del vector de expresión SST3-Ab en el microorganismo de la presente invención. Una realización particular de la invención lo constituye el anticuerpo de fusión que comprende la secuencia señal SS de secuencia -SEC ID NO6.

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del microorganismo de la invención que comprende la transfección o transformación de un microorganismo con un sistema de secreción tipo III (SST3) con la construcción genética o con el vector de expresión SST3-Ab de la invención.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del microorganismo SST3 de la invención, uso del microorganismo de la invención, en un procedimiento biotecnológico de secreción y/o inyección de anticuerpos recombinantes funcionales de interés.

Otro objeto particular de la invención es el uso del microorganismo SST3 de la presente invención en un procedimiento biotecnológico que consiste en la producción y secreción extracelular de un anticuerpo recombinante (ver Ejemplo 1).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso del microorganismo SST3 de la invención en la elaboración de un medicamento o composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades humanas, animales o de plantas.

Otro objeto de la invención lo constituye un medicamento o composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades humanas, animales o de plantas, en adelante medicamento SST3 de la invención, que comprende el microorganismo SST3 de la invención.

Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el uso del medicamento o composición terapéutica SST3 de la presente invención en un procedimiento terapéutico humano o veterinario.

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que el sistema de inyección de proteínas a células eucarióticas - sistemas de secreción tipo III (SST3)- presente en cepas patógenas de *E. coli* y otros microorganismos Gram negativos (p.ej. *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.) es capaz sorprendentemente de secretar al medio extracelular o inyectar eficientemente anticuerpos recombinantes activos (capaces de reconocer y unirse a su antígeno), en particular dAbs y, más en concreto los V_{HH}, al citoplasma de una célula eucariótica (p.ej. células humanas), y de forma particular el SST3 de cepas EPEC y EHEC. Este efecto de secreción o inyección se consigue mediante la fusión de los anticuerpos con la secuencia señal de secreción que reconoce el sistema de secreción (SS) tipo III (SST3: EspF₂₀, SEC ID NO6), la cual no impide que dichos anticuerpos sean funcionalmente activos una vez secretado (Ejemplo 1) o inyectados (Ejemplo 2). Empleando como modelo cepas enteropatógenas de *E. coli* portadoras de estos sistemas de inyección SST3 y dAbs procedentes de anticuerpos de camellos modificados para contener la señal reconocida por la maquinaria de inyección bacteriana, se ha comprobado que los anticuerpos son inyectados en forma activa al citoplasma de células humanas HeLa y que son capaces de unirse a un antígeno intracelular presente en ellas (Ejemplo 2). Además, esta inyección de anticuerpos funcionales desde una bacteria a una célula eucariótica se lleva a cabo sin transferencia de material genético alguno (DNA o RNA) como en el caso de infecciones con virus modificados o mediante la transferencia de DNA o RNA por métodos físicos o químicos.

Como sistema de inyección de proteínas desde la bacteria a la célula eucariótica se emplearon los sistemas de secreción de proteínas tipo III (SST3) y como caso particular los SST3 presentes en cepas de *E. coli* enteropatógenas (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC)^{13,14}. Se empleó como caso particular los anticuerpos recombinantes de menor tamaño conocido (aprox. 15 kDa) y formados por un único dominio V (*domain antibodies* dAb). Más concretamente, los anticuerpos recombinantes dAb elegidos como modelos en esta invención son dos clones V_{HH} con reactividad a

los antígenos proteína verde fluorescente GFP (clon Vgfp) y la enzima pancreática porcina α -amilasa (clon Vamy), previamente aislados por *phage display* y procedentes de genotecas obtenidas de camellos inmunizados con dichos antígenos.

5 Así, con el fin de estudiar las posibilidades de secreción y/o inyección de los anticuerpos recombinantes (monodominio, dAb) empleando el SST3 (de EPEC/EHEC) se decidió fusionar estos anticuerpos a las secuencias SS de los SST3 desarrollando una construcción génica. Como caso particular en esta invención, se empleó una SS de SST3 bien caracterizada y que corresponde a los 20 aminoácidos N-terminales de la proteína efectora EspF (EspF₂₀, SEC ID NO6), presente de manera conservada en las proteínas EspF tanto de las cepas de *E. coli* EPEC como EHEC³¹. Esta
10 SS había sido identificada mediante fusiones de EspF a la β -lactamasa.

Por tanto, un objeto de la presente invención lo constituye un microorganismo con un sistema de inyección de proteínas tipo III (SST3) útil para la secreción extracelular o inyección de anticuerpos funcionalmente activos en células eucariotas, en adelante microorganismo SST3 de la presente invención, que presenta una construcción genética
15 SST3-Ab que comprende, al menos, una secuencia de ADN que contiene la secuencia codificante de la región señal de secreción (SS) reconocida por el sistema SST3 unida o fusionada a una secuencia de ADN que contiene la secuencia codificante de un anticuerpo y que permite la expresión de dicho anticuerpo de fusión funcionalmente activo en su citoplasma y su secreción o inyección exterior.

20 Tal como se utiliza en la presente invención el término “microorganismo” se refiere a cualquier bacteria natural, patógena o no patógena, incluyendo cepas atenuadas, comensales, probióticas, ambientales, etc. aisladas en la naturaleza o a cualquier cepa o especie bacteriana con cualquier tipo de modificación genética, ya sean éstas derivadas de cepas patógenas o no patógenas, cepas atenuadas, comensales, probióticas, ambientales, etc., y ya sean estas modificaciones aisladas mediante selecciones naturales, procesos de mutagénesis al azar o dirigida, o por técnicas de DNA recombinante, preferentemente un microorganismo Gram negativo, que presenta un sistema de secreción de proteínas tipo III
25 (SST3) perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Shigella flexnerii*, *Citrobacter rodentium*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* y *Erwinia amylovora*.

30 El sistema de secreción de proteínas tipo III, tal como se refiere en la presente invención, incluye tanto un sistema salvaje o natural u otro modificado o seleccionado artificialmente mediante cualquier técnica a partir de los primeros. El sistema SST3 modificado puede contener mutaciones en uno o múltiples componentes, ya sean estas producidas espontáneamente o mediante mutagénesis *in vitro* o *in vivo*, así como puede ser un SST3 formado por la expresión de componentes obtenidos de diferentes cepas y/o especies bacterianas.

35 Tal como se utiliza en la presente invención el término “célula eucariótica” se refiere a cualquier célula eucariota procedente de un animal, de plantas, hongos, levaduras y protozoos; de cualquier linaje celular (p.ej. células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, células musculares, células neuronales, gliales, linfoides y otras células sanguíneas como eritrocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, o células presentadoras de antígenos como las células dendríticas, las células M, etc.) así como células troncales (*stem cells*) ya sean embrionarias o de organismos adultos.

40 Tal como se utiliza en la presente invención el término “señal de secreción reconocida por el sistema SST3”, es un fragmento de proteína (péptido) o RNA de un efector natural de SST3, o la molécula completa de RNA o proteína de un efector SST3, o un fragmento de proteína o RNA, o una molécula completa, obtenida mediante DNA recombinante o síntesis química y que haya mostrado la capacidad de ser reconocida por cualquier SST3 como señal de secreción.

45 Tal como se utiliza en la presente invención el término “anticuerpo funcionalmente activo” se refiere a un anticuerpo recombinante o minianticuerpo que mantiene su capacidad de unión a antígeno perteneciente, que se define como fragmentos derivados de anticuerpos construidos por tecnología de ADN recombinante, que, pese a su menor tamaño, conservan la capacidad de unión al antígeno ya que mantienen al menos un dominio variable de inmunoglobulina donde residen las zonas de unión a antígenos, y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: Fab, F(ab')₂, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs). En el marco de la presente invención, se entiende por anticuerpos recombinantes monodominio y/o dominios tipo inmunoglobulina con capacidad de unión y reconocimiento independiente, tanto a los dominios variables de cadena pesada (VH), a los dominios variables de cadena ligera (VL), a los anticuerpos recombinantes de camelidos (VHH), los anticuerpos recombinantes de camelidos humanizados, los anticuerpos recombinantes de otras especies camelizadas, los anticuerpos monodominio IgNAR de peces cartilaginosos; es decir, que se incluyen tanto dominios que de forma natural son monodominio (caso de VHH e IgNAR), como anticuerpos que por ingeniería se han alterado para que por sí solos sean capaces de interactuar con el antígeno y mejorar sus propiedades de estabilidad y solubilidad. Se incluye en esta
50 definición cualquier modificación de los anticuerpos recombinantes como su multimerización o la fusión a cualquier molécula (p.ej. toxinas, enzimas, antígenos, otros fragmentos de anticuerpos, etc.).

65 El anticuerpo funcionalmente activo puede ser obtenido de un ser humano o un animal (p.ej. camellos, llamas, vicuñas, ratones, ratas, conejos, caballos, tiburones nodriza, etc.) o mediante técnicas de DNA recombinante o síntesis química de genes, o bien desde o selección *in vitro* o *in vivo* de genotecas de anticuerpos, empleando cualquier cepa de *Escherichia coli*, patógena o no patógena, o de cualquier otra cepa o especie bacteriana, conteniendo un SST3 de cualquier origen y empleando cualquier señal reconocida ese sistema SST3, a cualquier célula eucariótica.

ES 2 322 116 B1

Por tanto, un objeto particular de la invención es el microorganismo de la invención donde el microorganismo es una bacteria, preferentemente una bacteria Gram negativa no patógena o atenuada.

5 De acuerdo con otro modo de realización preferido de la invención la bacteria Gram negativa es una bacteria no patógena o atenuada de animales perteneciente, a título ilustrativo, al siguiente grupo: *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexnerii* y *Citrobacter rodentium*) o de plantas perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* y *Erwinia amylovora*.

10 Un objeto más particular de la presente invención lo constituye una cepa de *E. coli* enteropatógenas (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC), y en la que la construcción genética de ADN SST3-Ab comprende una secuencia de ADN codificante de SST3 de -SEC ID NO5 y donde la secuencia de ADN codificante del anticuerpo es un anticuerpo monodominio dAb, preferentemente de tipo V_{HH}. Una realización concreta de la invención está constituida por un microorganismo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: las cepas EPEC O127:H6 y EHEC O157:H7 (ver Ejemplo 1 y 2).

Otro objeto de la presente invención lo constituye la construcción genética SST3-Ab, en adelante construcción genética SST3-Ab de la invención, que comprende, al menos:

20 iii) una secuencia de ADN codificante de una señal de secreción de tipo III, y

iv) una secuencia de ADN codificante de un anticuerpo de interés.

25 La secuencia de ADN codificante de una señal de secreción tipo III (SS) utilizada en la construcción genética SST3-Ab de la invención puede estar constituida por la secuencia de DNA codificante de la secuencia señal de secreción (SS) de *E. coli* o de un fragmento de dicha secuencia, o una secuencia de ADN análoga, o una secuencia de nucleótidos que codifica para una variante, natural o artificial de SS o de un fragmento de la misma que comprende el dominio mencionado mínimo para que sea reconocido y secretado/inyectado por la maquinaria SST3^{15,16}. Como se ha comentado anteriormente las SS suelen estar localizadas próximas al extremo N-terminal de las proteínas efectoras, y están constituidas por los primeros 15-30 aminoácidos de la proteína efectora, o en los primeros 15-30 codones de su mRNA.

35 En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análogo” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida en base a las secuencias de ADN mostradas en la presente invención, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que codifique para un péptido o proteína con actividad similar a la original, es decir, como señal de secreción tipo III (SS).

40 En general, una secuencia de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

45 Por otro lado, la secuencia de ADN codificante de una señal de secreción de tipo III (SS), como elemento de la construcción genética SST3-Ab de la invención, puede unirse o fusionarse en cualquier punto de la secuencia codificante de un anticuerpo recombinante (extremos 5' ó 3' del DNA o RNA, así como cualquier secuencia interna).

50 Según otro modo de realización preferido de la presente invención lo constituye la secuencia de ADN codificante de dicho anticuerpo de fusión de la invención que puede construirse en este sentido o en sentido inverso, con o sin secuencias adicionales de ADN. La construcción genética SST3-Ab de la invención también puede contener, en caso necesario y para permitir un mejor aislamiento o detección del anticuerpo de fusión de interés, una secuencia de ADN que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o detección de dicha proteína. Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye cualquier secuencia de ADN codificante de un péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o la detección del anticuerpo de fusión SST3, por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, una secuencia de polihistidina (6xHis), una secuencia peptídica reconocible por un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, E-tag para su identificación, o cualquier otra que sirva para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad: péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, FLAG) (Using antibodies: a laboratory manual. Ed. Harlow and David Lane (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: Tagging proteins. Pp. 347-377).

60 Otro objeto particular de la invención lo constituye la construcción genética SST3-Ab de la invención donde la secuencia de ADN codificante de una señal de secreción de tipo III (SS) es la secuencia SS de *E. coli*, preferentemente un fragmento de la misma, y más preferentemente la SEC ID NO5 que codifica los primeros 20 aminoácidos N-terminales de EspF (EspF20), donde se encuentra la señal de secreción tipo III de su efector.

ES 2 322 116 B1

Otra realización particular de la invención lo constituye una construcción genética SST3-Ab de la invención en la cual la secuencia codificante de un anticuerpo funcionalmente activo está constituida por anticuerpo de camello, y más preferentemente una construcción genética de SEC ID NO1 y NO3 (ver ejemplo 1 y 2).

5 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una construcción genética SST3-Ab de la invención que contiene una secuencia linker o secuencia de unión entre las secuencias que codifican para la secuencia SS y secuencia de anticuerpo que puede incluir, si se desea, una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimáticos o químicos con el fin de liberar el anticuerpo de fusión. En este caso, la construcción genética SST3-Ab de la invención puede incluir una secuencia
10 de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimáticos o químicos. En una realización particular dicha secuencia comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un sitio de reconocimiento de corte de una proteasa, por ejemplo, una enteroquinasa, Arg-C endoproteasa, Glu-C endoproteasa, Lys-C endoproteasa, factor de coagulación Xa y similares. En otra realización particular, dicha secuencia de ADN comprende una secuencia de ADN que codifica para un sitio susceptible de ser específicamente
15 escindido por un reactivo químico tal como, por ejemplo, bromuro de cianógeno que escinde residuos de metionina o cualquier otro reactivo químico adecuado.

La construcción genética SST3-Ab de la invención puede obtenerse por un experto medio mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook *et al.* "Molecular cloning", a Laboratory Manual
20 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 vol 1-3). Dicha construcción genética de ADN puede estar integrada en un vector de expresión que permite la regulación de la expresión de la secuencia de ADN codificante del anticuerpo de fusión en condiciones adecuadas.

Por tanto, otro objeto de la presente invención lo constituye un vector de expresión genética, en adelante vector
25 de expresión SST3-Ab, que contiene la construcción genética SST3-Ab de la presente invención y que permite la expresión de dicha construcción en el citoplasma del microorganismo de la invención.

En general, el vector de expresión SST3-Ab de la presente invención comprende, al menos, la secuencia de ADN
30 SST3-Ab, al menos, un promotor que dirige su transcripción (*pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *pBAD*, *ptet*, etc), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan la transcripción del gen y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (*t1t2*, etc), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso
35 concreto entre plásmidos de expresión de microorganismos que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora y del tipo de uso que se quiera realizar. Por tanto, según un modo de realización particular de la presente invención dicho vector es un plásmido. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia al igual que para la transformación de microorganismos
40 se pueden utilizar diferentes métodos - transformación química, electroporación, microinyección, etc. - descritos en diversos manuales [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.]. Además de plásmidos, pueden utilizarse otros vectores como bacteriofagos, en fagemidos, cósmidos, cromosomas artificiales o integrando en cualquier punto del cromosoma o cromosomas.

45 Otra realización particular de la invención lo constituye un vector de expresión SST3-Ab en el que el vector es un plásmido que comprende como secuencia SS la SEC ID NO5 y como secuencia de un anticuerpo recombinante una secuencia de un anticuerpo de camello. Otra realización particular lo representa un plásmido elaborado en la presente invención como por ejemplo los plásmidos pEspFVamy y pEspFVgfp (ver Ejemplo 1 y 2).

50 Otro objeto de la invención lo constituye el anticuerpo de fusión SST3-AB obtenido mediante la expresión de la construcción genética o a partir del vector de expresión SST3-Ab en el microorganismo de la presente invención. Una realización particular de la invención lo constituye el anticuerpo de fusión que comprende la secuencia señal SS de secuencia SEC ID NO6.

55 Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la construcción genética y del vector de expresión SST3-Ab de la presente invención para la obtención del microorganismo de la invención.

60 Así, otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del microorganismo de la invención que comprende la transfección o transformación de un microorganismo con un sistema de secreción tipo III (SST3) con la construcción genética o con el vector de expresión SST3-Ab de la invención.

Esta invención permitiría emplear estas cepas bacterianas como factorías de producción de anticuerpos recombinantes que pueden ser secretados al medio extracelular sin necesidad de lisis celular, y purificados posteriormente.
65 Igualmente se pueden emplear estos microorganismos de manera terapéutica, de tal forma que cepas bacterianas no patógenas o atenuadas de patógenos (p.ej. de *E. coli* o *Salmonella* o *Yersinia*), pero portadoras de los sistemas de secreción e inyección de proteínas, permiten la secreción al medio o la inyección al citoplasma de células eucarióticas humanas diana de anticuerpos recombinantes que regulan la acción de elementos extracelulares o el metabolismo de

la célula o de algún tipo de proceso celular, inhibiendo o activando cascadas de señalización o factores de transcripción. (p.ej. inactivando enzimas o proteínas implicadas en patologías). Algunas enfermedades y procesos celulares que podrían ser objeto de tratamiento con esta terapia son: angiogénesis tumoral, cáncer, procesos inflamatorios, inmunodepresión y trasplantes, e infecciones virales, bacterias y fúngicas.

5

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del microorganismo SST3 de la invención, uso del microorganismo de la invención, en un procedimiento biotecnológico de secreción y/o inyección de anticuerpos recombinantes funcionales de interés.

10 La secreción del anticuerpo SST3 al medio extracelular por parte del microorganismo SST3 de la invención puede llevarse a cabo directamente en el medio de cultivo donde se crecen *in vitro* para el posterior uso del sobrenadante o la purificación a partir de él del anticuerpo o directamente al medio encontrado cuando se encuentra en un ser vivo, ya sea animal, preferentemente un ser humano, o planta.

15 Otro objeto particular de la invención es el uso del microorganismo SST3 de la presente invención en un procedimiento biotecnológico que consiste en la producción y secreción extracelular de un anticuerpo recombinante (ver Ejemplo 1). Según una realización particular de la invención, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el anticuerpo recombinante pertenece al siguiente grupo: Fab, F(ab')₂, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs), preferentemente dAbs, y más preferentemente V_{HH} de camellos.

20

Estos anticuerpos pueden ser utilizados en distintos sectores industriales como salud humana y veterinaria (diagnóstico y terapia), en procesos biotecnológicos, en el sector agroalimentario, biorremediación, síntesis química, etc.

25 El anticuerpo SST3 de la invención puede ser utilizado directamente o tras la purificación del anticuerpo a partir del sobrenadante, mediante distintos sistemas.

Para el caso de que se quiera usar el microorganismo de la invención per se como compuesto terapéutico de enfermedades humanas o veterinarias, y de forma previa a su administración, deben elaborarse como composiciones farmacéuticas o alimentarias (cepa probiótica) en la forma adecuada. En este sentido, pudiera formar parte (sola o en combinación con otros microorganismos incluyendo probióticos) (Combination of probiotics EPI359816 Valio Ltd). Además, puede incluirse en preparaciones farmacéuticas en forma de cápsulas (Micro-encapsulated lactobacilli for medical applications WO 96/38159), en forma liofilizada, líquida, en píldoras o geles.

30

35 Por lo tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso del microorganismo SST3 de la invención en la elaboración de un medicamento o composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades humanas, animales o de plantas.

En este sentido, otro objeto de la invención lo constituye un medicamento o composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades humanas, animales o de plantas, en adelante medicamento SST3 de la invención, que comprende el microorganismo SST3 de la invención.

40

Un objeto particular lo constituye un medicamento SST3 de la invención que es útil para el tratamiento de enfermedades humanas pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: angiogénesis tumoral, cáncer, procesos inflamatorios, inmunodepresión y trasplantes, e infecciones virales, bacterias y fúngicas.

45

Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el uso del medicamento o composición terapéutica SST3 de la presente invención en un procedimiento terapéutico humano o veterinario.

50 Descripción de las figuras

Figura 1.- *Esquema de los plásmidos utilizados para la translocación por el SST3*. Los anticuerpos V_{HH} están fusionados a la señal EspF₂₀ en el extremo N-terminal y a los epítotos 6xHis y E-tag en el extremo C-terminal.

55 Figura 2.- *Secreción mediante SST3 de V_{HH}S al medio extracelular en EHEC y EPEC*. Sobrenadantes procedentes de la inducción en DMEM de las cepas de *E. coli* EHEC (A) y EPEC (B), silvestres y mutantes en el SST3, llevando los plásmidos indicados en cada carril. Las proteínas presentes en los sobrenadantes se precipitaron con TCA y analizaron por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Puntas de flecha indican el anticuerpo de fusión de la invención.

60 Figura 3.- *Inmunodetección de V_{HH}S en EHEC y EPEC*. (A) Sobrenadantes y (B) extractos celulares totales de la inducción en medio DMEM de las cepas de *E. coli* EPEC y EHEC, silvestres y mutantes para SST3, llevando los plásmidos indicados en cada carril, analizados mediante *Western blot* revelado con el anticuerpo monoclonal anti-Etag-POD.

65 Figura 4.- *Ausencia de lisis de EPEC y EHEC tras inducción de los V_{HH}*. (A) Sobrenadantes y extractos celulares totales procedentes de la inducción en DMEM de las cepas de *E. coli* EPEC y EHEC, silvestres y mutantes para la secreción tipo III, llevando los plásmidos indicados en cada carril, analizados mediante *Western blot* revelado con el anticuerpo monoclonal anti-GroEL-POD.

ES 2 322 116 B1

Figura 5.- *La secreción de V_{HH} depende de la señal tipo III EspF₂₀*. Comparación de la proteína secretada en cepas EHEC y EPEC con los plásmidos pEspF-Vgfp y pΔsVgfp. (A) SDS-PAGE de sobrenadantes precipitados con TCA teñido con azul de Coomassie. (B) Western blot con mAb anti-E-tag-POD de sobrenadantes y extractos celulares totales.

5

Figura 6.- *Solubilidad de las fusiones EspF-VHH*. Los sobrenadantes de los cultivos tras inducción se ultracentrifugaron (100.000 xg) y se analizó mediante *Western blot* con mAb anti-E-tag-POD la presencia de las fusiones EspF-V_{HH} en los sobrenadantes (S) y *pellet* (P) resultantes.

10

Figura 7.- *Actividad de los anticuerpos V_{HH} secretados por el SST3*. Ensayo de ELISA mostrando los datos de unión de los V_{HH} anti-amilasa (Vamy) y anti-GFP (Vgfp) frente a los antígenos GFP, α -amilasa y BSA. El ELISA fue revelado con mAb anti-E-tag-POD y se midió la Absorbancia a 490 nm (OD 490 nm).

15

Figura 8.- *Fusiones EspF-VHH purificadas tras secreción SST3*. Tinción con azul de Coomassie de las proteínas purificadas EspF-Vgfp (carril 1) y EspF-Vamy (carril 2) tras cromatografía de afinidad a metales analizadas por SDS-PAGE.

20

Figura 9.- *Curva de unión a los antígenos α -amilasa y albúmina bovina (BSA) de la fusión EspF-Vamy purificada*. La curva se realizó desde los valores de Absorbancia a 490 nm (OD 490 nm) obtenidos de ensayos ELISA con ambos antígenos y a las concentraciones de la fusión EspF-Vamy indicadas.

25

Figura 10.- *Curva de unión a los antígenos GFP y albúmina bovina (BSA) de la fusión EspF-Vgfp purificada*. La curva se realizó desde los valores de Absorbancia a 490 nm (OD 490 nm) obtenidos de ensayos ELISA con ambos antígenos y a las concentraciones de la fusión EspF-Vgfp indicadas.

30

Figura 11.- *Esquema del plásmido pEspF-Vamy-bla, derivado de pCX340 que expresa bajo el control del promotor Ptrc la fusión EspF20-Vamy con los epítomos 6xhis, E-tag y la β -lactamasa*. Se indican los sitios de restricción más importantes.

35

Figura 12.- *Ensayo de translocación de β -lactamasa a células HeLa*. Células HeLa en cultivo *in vitro* fueron infectadas con cepas EPEC silvestres (wt) y mutantes en SST3 (Δ escF) con los plásmidos indicados (pCX340, pEspF-bla y pEspF-Vamy-bla) e incubadas con el sustrato CCF2/AM. Las células HeLa aparecen en los colores verde, más brillante en la figura, cuando el sustrato CCF2/AM no ha sido hidrolizado por la β -lactamasa y en azul, más oscuras en la figura, en caso contrario, indicando una translocación positiva de la fusión con β -lactamasa. En la figura se muestra el resultado negativo que se obtuvo en las cepas EPEC wt llevando el vector vacío pCX340 y en el caso de EPEC DescN llevando todos los plásmidos, sin embargo se obtuvo un resultado positivo para la cepa EPEC wt llevando los plásmidos; pEspF-bla, pEspF-Vamy-bla.

40

Figura 13.- *Expresión de las fusiones con β -lactamasa empleadas en el ensayo de translocación (Fig.12)*. Western blot de los extractos celulares totales utilizando el mAb anti- β -lactamasa como anticuerpo primario y un anti-Ig ratón-POD como secundario.

45

Figura 14.- *Actividad intracelular de las fusiones EspF-V_{HH}*. Colocalización de GGA2-GFP y la fusión EspF-Vgfp determinada por microscopía de fluorescencia. Células HeLa en cultivo transfectadas con el plásmido pgFP-GGA2, fueron infectadas (o no) con EPEC con los plásmidos pEspF-Vgfp o pEspF-Vamy (como se indica). Se muestran las imágenes de contraste de fase y de microscopía de fluorescencia en verde (GFP), que marca la fusión GGA2-GFP, y en rojo (anti-E-tag) que marca las fusiones EspF-V_{HH}. La mezcla de los dos colores se muestra en la columna derecha (*merge*).

50

Figura 15.- *Actividad intracelular de las fusiones EspF-V_{HH}*. Colocalización de GGA2-GFP y la fusión EspF-Vgfp determinada por microscopía confocal. Células HeLa en cultivo transfectadas con el plásmido pgFP-GGA2, fueron infectadas con EPEC con los plásmidos pEspF-Vgfp o pEspF-Vamy (como se indica). Se muestra las imágenes de microscopía confocal correspondientes al verde (GFP), que marca la fusión GGA2-GFP, al rojo (anti-E-tag) que marca las fusiones EspF-V_{HH}, y al azul (anti-Int280) que marca la Intimina presente en superficie de EPEC. La mezcla de los tres colores se muestra en la columna derecha (*merge*).

55

Figura 16.- *Ensayos de inmunoprecipitación*. A) Inmunoprecipitación con anti-E-tag mAb acoplado a Sefarosa-proteína G de extractos de células HeLa expresando GGA2-GFP, o controles no transfectados (NT), obtenidos tras infección con EPEC transformados con los plásmidos pEspF-Vgfp o pEspF-Vamy. Se muestran los Western blots revelados con anti-E-tag mAb o anti-GFP mAb de las proteínas inmunoprecipitadas. (B) Western blots de los lisados eucarióticos empleados en la inmunoprecipitación revelados con los mAbs anti-E-tag, anti-GFP y anti- β -tubulina.

65

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

- 5 *La secreción del anticuerpo de fusión de la invención (EspF-V_{HH}) funcionalmente activo al medio extracelular es dependiente de SST3*

Se construyeron dos plásmidos derivados del vector pSA10, nombrados pEspFVamy y pEspFVgfp, con fusiones codificantes de los primeros 20 aminoácidos N-terminales de EspF (EspF₂₀), que son la señal de secreción tipo III de este efector (SEC ID NO6), y de los camelbodies V_{HH} anti-amilasa (Vamy) y anti-GFP (Vgfp) (Fig. 1; SEC ID NO1 a la 4). Además, se incluyeron epítomos 6xhis y E-tag en el extremo C-terminal de estas fusiones para facilitar la inmunodetección y purificación de las proteínas (SEC ID NO2 y SEC ID NO4, respectivamente).

Los plásmidos pEspFVamy y pEspFVgfp se emplearon para transformar a las cepas EPEC O127:H6 y EHEC O157:H7 (Tabla 1). Las mismas cepas se transformaron con el vector vacío pSA10, como control. Bacterias de estas cepas conteniendo estos plásmidos se crecieron en medio DMEM a 37°C, que activa artificialmente el SST3, y se indujo la expresión de las fusiones con IPTG durante 3.5 horas (este tiempo se demostró óptimo en experimentos preliminares con inducciones entre 1 y 16 horas). Posteriormente, se analizaron las proteínas presentes en los sobrenadantes mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Se observó la presencia que bandas de proteína de aprox. 22-23 kDa en los sobrenadantes de los cultivos, que podrían corresponder a ambos anticuerpos V_{HH} fusionados a la señal N-terminal EspF₂₀ y a los epítomos C-terminales 6xhis y E-tag (Fig. 2A y 2B, carriles 2 y 3; flechas). Estas bandas no aparecían en los sobrenadantes de las cepas con el vector pSA10 (Fig. 2A y 2B, carril 1), donde si aparecían otras proteínas secretadas (p.ej. EspC/P, EspB, EspD, EspA).

Para demostrar que la secreción de los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} se producía por el SST3, se transformaron cepas mutantes defectivas en el SST3, EHEC DescN::Km³² y EPEC DescF::Km³⁸, con los plásmidos pSA10, pEspF-Vamy y pEspFVgfp. Tras la inducción con IPTG en idénticas condiciones a la realizadas con la cepa silvestre, se analizaron las proteínas presentes en los sobrenadantes y se observó la ausencia de las proteínas secretas por el SST3 (p.ej. EspD, EspB, EspA) así como de los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} (Fig. 2A y 2B, carriles 4 a 6). Como control, la secreción de las proteínas EspC o EspP (secretadas por sistema de secreción tipo V) no se alteró por las mutaciones DescF o DescN (Fig. 2A y 2B).

Para identificar inequívocamente los anticuerpos de fusión EspF₂₀-V_{HH} secretados se aprovechó que ambos contienen en el extremo C-terminal un epítipo E reconocido específicamente por un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-E-tag. Las proteínas presentes en los sobrenadantes de los cultivos anteriores, de cepas silvestres EPEC y EHEC, así como de sus mutantes ΔescN o ΔescF, se analizaron por SDS-PAGE y Western blot revelado con el mAb anti-E-tag conjugado a peroxida (POD) (Fig. 3A).

Se puede observar que en los sobrenadantes de las cepas silvestres de EPEC y EHEC se detectan ambos anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} con el mAb anti-E-tag-POD (Fig. 3A, carriles 2 y 3) mientras que estas proteínas no se detectan en los sobrenadantes de las cepas mutantes ΔescN o ΔescF (Fig. 3A, carriles 5 y 6). Como control, se aprecia que estas bandas no aparecen en los sobrenadantes de las cepas silvestres transformadas con pSA10 (Fig. 3A, carril 1). Por otra parte, al analizar por SDS-PAGE y Western blot con anti-E-tag mAb-POD los extractos celulares totales de estos cultivos se observó que ambas fusiones EspF-V_{HH} se producen intracelularmente tanto en cepas silvestres como mutantes ΔescN o ΔescF (Fig. 3B), e incluso se aprecia un incremento de acumulación intracelular en los mutantes. Estos resultados indican que los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} sólo se secretan al medio extracelular en presencia de un SST3 funcional.

Para descartar que una lisis celular mayor de los cultivos que expresan las proteínas de fusión EspF-V_{HH} en cepas conteniendo un SST3 activo pudiese explicar la aparición de los anticuerpos en el medio extracelular se realizó un control de lisis detectando la presencia de la chaperona citoplasmática mayoritaria GroEL en los sobrenadantes de los cultivos. Mediante Western blot con un mAb anti-GroEL-POD (Fig. 4) se comprobó que GroEL era detectable sólo a niveles muy bajos en los sobrenadantes de los cultivos (Fig. 4A). Además, la concentración de GroEL no varía entre las cepas EPEC o EHEC silvestres y mutantes ΔescN o ΔescF expresando las proteínas de fusión EspF-V_{HH}, ni con respecto a los niveles encontrados en estas cepas con el vector vacío pSA10 (Figura 4A, carriles 1 y 4). Los niveles de GroEL intracelulares son igualmente homogéneos en todas las cepas e independientemente de los plásmidos que contienen (Fig. 4B). Por lo tanto, la expresión de las fusiones EspF-V_{HH} no inducen una lisis celular que justifique su presencia en los sobrenadantes de las cepas silvestres EPEC o EHEC con un SST3 activo.

Para confirmar que las fusiones de anticuerpos EspF-V_{HH} eran secretadas de forma dependiente de la señal EspF₂₀ se eliminó esta secuencia del plásmido pEspF-Vgfp construyendo el derivado pAsVgfp con la secuencia ΔsVgfp (SEC ID NO 7 y 8). Ambos plásmidos se emplearon para transformar cepas silvestres de EPEC y EHEC y se analizó las proteínas presentes en los sobrenadantes de los cultivos tras inducir con IPTG. Como puede observarse en la Fig. 5, la banda correspondiente al anticuerpo Vgfp puede detectarse tanto en tinción con Coomassie (Fig. 5A) como en Western blot con anti-E-tag-POD (Fig. 5B) en los sobrenadantes de las cepas EPEC y EHEC transformadas con pEspF-Vgfp, pero no en las transformadas con pΔsVgfp. La producción intracelular de la proteína sin señal EspF se detectó con anti-E-tag-POD en los extractos totales de las células conteniendo pΔsVgfp (Fig. 5B). Por lo tanto, la secuencia EspF₂₀ es necesaria para la secreción de las proteínas de fusión EspF-V_{HH} tanto en cepas EPEC como en EHEC. Debido al

ES 2 322 116 B1

idéntico comportamiento de las cepas EHEC y EPEC en la secreción de los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} por el SST3, los siguientes experimentos se realizaron en cepas de EPEC salvo cuando se indica lo contrario.

5 Para confirmar que los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} secretados al medio se encontraban solubles y no asociadas a vesículas de membrana o formando algún tipo de agregado proteico, se realizaron centrifugaciones a alta velocidad (100.000 xg, 1 hora) de los sobrenadantes de cultivos de EPEC conteniendo las proteínas de fusión EspF-V_{HH} y EspF-Vgfp. Tras la centrifugación, las proteínas presentes en los sobrenadantes (S) y los *pellets* (P) se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con anti-E-tag-POD (Fig. 6). En estos experimentos se observó que casi la totalidad de la proteína secretada correspondiente a ambas fusiones EspF-V_{HH} se hallaba soluble tras la centrifugación, lo que indicaba que no se encontraban agregadas ni formando parte de vesículas de membrana.

15 La característica principal de un anticuerpo es su capacidad de unión a un antígeno de manera específica. Para comprobar que esta característica se mantenía en los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} secretados, se realizaron ensayos de ELISA con los sobrenadantes de los cultivos de cepas EPEC transformadas con los plásmidos pEspFV_{HH} y pEspFVgfp. En los ensayos se emplearon los sobrenadantes obtenidos tras la inducción y se añadieron a placas recubiertas con los antígenos de cada uno de estos anticuerpos de fusión (α -amilasa y GFP) así como un antígeno control negativo para ambos (BSA). Tras varios lavados con PBS, la unión de los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} a los antígenos se reveló con el mAb anti-E-tag conjugado con peroxidasa. Como se aprecia en la Fig. 7, se observó una unión específica de cada anticuerpo de fusión (EspF-V_{HH} y EspF-Vgfp) a su antígeno correspondiente (α -amilasa y GFP) y en ningún caso se observó reactividad de las fusiones a otros antígenos (Fig. 7).

20 Se realizaron experimentos similares con la cepa EHEC y se pudo comprobar también este resultado. Por lo tanto, la unión de los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} a los antígenos confirmaba que los anticuerpos secretados por el sistema SST3 de EPEC y EHEC eran funcionalmente activos. En estos experimentos se observó también que los sobrenadantes conteniendo el anticuerpo de fusión EspF-Vgfp producían siempre mayores señales de ELISA (a GFP) que los que contenían EspF-V_{HH} (frente α -amilasa), pese a que los niveles de ambas fusiones en los sobrenadantes eran muy similares (véase Fig. 2). Esto es debido a la diferente afinidad de estos anticuerpos por sus antígenos (véase a continuación).

30 La colocación en el extremo C-terminal de epítipo de 6xhis dio la posibilidad de realizar una purificación de los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} en los sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad con resinas cargadas con metales (p.ej. Cobalto). Tras este paso cromatográfico, ambas anticuerpos de fusión se obtuvieron con >95% pureza como reveló su análisis por SDS-PAGE y tinción con Coomassie (Fig. 8).

35 A continuación se realizaron ensayos de ELISA frente a GFP y α -amilasa con diferentes concentraciones de los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH}, para obtener las curvas de unión de estos anticuerpos a sus antígenos correspondientes. Como se observa en las Fig. 9 y 10, se obtuvieron curvas características de una unión específica de cada anticuerpo por su antígeno correspondiente, mostrando mayor afinidad la fusión EspF-Vgfp que la fusión EspF-V_{HH}.

40 Ejemplo 2

Inyección a células eucarióticas de fusiones EspF-V_{HH} con β -lactamasa

45 Para obtener una prueba de si los anticuerpos de fusión EspF-V_{HH} de la invención podían translocarse con el SST3 desde una bacteria al citoplasma de una célula eucariótica se empleó inicialmente un ensayo basado en la actividad catalítica de la enzima β -lactamasa, ausente en las células eucarióticas. Se había descrito que la enzima β -lactamasa, carente de su péptido señal natural (Δ s), podía translocarse desde el citoplasma de cepas silvestres EPEC al citoplasma de la célula eucariótica. Para ello, se empleó la señal de secreción (SS) de SST3, como EspF₂₀, fusionada al extremo N-terminal de β -lactamasa (Δ s). Las fusiones translocadas (p.ej. EspF₂₀- β -lactamasa) fueron fácilmente detectables en el citoplasma de la célula eucariótica gracias a la utilización de un sustrato fluorescente de la β -lactamasa (CCF2/AM; ver materiales y métodos) que puede añadirse a las células en cultivo y que pasa de emitir de verde a azul si es degradado por la enzima.

55 Para estos ensayos se empleó el vector pCX340, que codifica la β -lactamasa (Δ s) bajo el control del promotor *P_{trc}* inducible por IPTG (Fig. 11). Se construyeron dos derivados de pCX340 en los que se fusionó en el extremo N-terminal de la β -lactamasa la fusión EspF₂₀-V_{HH} (pEspF-V_{HH}-bla: -SEC ID NO11 y 12) o la señal EspF₂₀ (pEspF-bla: SEC ID N09 y 10) como control positivo.

60 Se infectaron células HeLa con bacterias EPEC, silvestres y mutantes Δ escF, transformadas con cada uno de estos tres plásmidos. Tras inducir con IPTG la expresión de los anticuerpos de fusión, se añadió el sustrato CCF2/AM para comprobar si existía actividad β -lactamasa en el citoplasma de las células HeLa. Así, se pudo comprobar al microscopio de fluorescencia (Fig. 12) que las células HeLa infectadas con bacterias EPEC silvestres y transformadas con los plásmidos pEspF-V_{HH}-bla o pEspF-bla emitían en azul (por lo tanto mostraban actividad β -lactamasa) mientras que aquellas infectadas con bacterias EPEC silvestres con el vector pCX340, o con cualquiera de los plásmidos en el caso de los mutantes Δ escF, emitían en verde y, por lo tanto, no habían translocado el anticuerpo de fusión con β -lactamasa.

La expresión en todas las bacterias empleadas de los anticuerpos de fusión que contenían β -lactamasa se comprobó mediante Western blot con anticuerpos anti- β -lactamasa (Fig. 13). Por lo tanto, este experimento demostró por primera vez que un anticuerpo V_{HH} (p.ej. el clon Vamy) podía translocarse al citoplasma de una célula eucariótica desde cepas EPEC silvestres empleando el SST3.

A continuación se decidió investigar si los anticuerpos de fusión EspF- V_{HH} eran capaces de reconocer su antígeno específico una vez inyectados al citoplasma de la célula eucariótica. Una forma de tener una prueba de la unión de un antígeno intracelular por los anticuerpos de fusión EspF- V_{HH} fue demostrar la colocalización de antígeno y anticuerpo de fusión en el citoplasma de la célula eucariótica mediante microscopia de fluorescencia y confocal. Se podía emplear los anticuerpos de fusión EspF-Vgfp para comprobar si eran capaces de unir a la proteína GFP expresada de forma heteróloga en el citoplasma de células HeLa. Como se quería poder detectar la colocalización de antígeno y anticuerpo, se precisó primero anclar la GFP en un punto concreto de la célula. Para ello se emplearon fusiones de la GFP a la proteína GGA2, un receptor de clatrina que se localiza en la cara citoplásmica de las membranas del aparato de Golgi³⁹. Para la detección de los anticuerpos de fusión EspF- V_{HH} se empleó inmunofluorescencia indirecta con el mAb anti-E-tag y un anticuerpo secundario anti-ratón IgG marcado con Alexa-594, un fluoróforo que emite en rojo y cuya fluorescencia es claramente distinguible de la emisión en verde de la GFP. Como control negativo se utilizó el anticuerpo de fusión EspF-Vamy, que no une al antígeno GFP.

Por lo tanto, se transfectaron células HeLa en cultivo con un plásmido que expresa la proteína de fusión GGA2-GFP y se infectaron posteriormente estos cultivos con bacterias EPEC que expresaban los anticuerpos de fusión EspFVgfp o EspFVamy. Las células HeLa se fijaron y procesaron para microscopía de fluorescencia tras tinción con los anticuerpos anti-E-tag y anti-ratón IgG-Alexa-594. Como se observa en la Fig. 14, se pudo comprobar que sólo en el caso de las células infectadas con la cepa de EPEC expresando el anticuerpo de fusión EspF-Vgfp se observaba una colocalización clara del anticuerpo (rojo; Fig. 14) con la proteína de fusión GGA2-GFP (verde; Fig. 14) que marcaban específicamente una región de membranas cercana al núcleo y que corresponde con el aparato de Golgi. Por el contrario, en las células HeLa infectadas con las bacterias expresando el anticuerpo de fusión EspF-Vamy sólo se podía observar una fluorescencia difusa con el anticuerpo anti-E-tag (rojo) y que no colocalizaba con la posición de la proteína de fusión GGA2-GFP (verde). La fluorescencia difusa en rojo detectada con anti-E-tag en células infectadas con EPEC/pEspFVamy fue claramente superior a la señal detectada en células no infectadas (Fig. 14). Además, gracias a la presencia en los cultivos de células HeLa no transfectadas, y que por lo tanto no expresaban la proteína de fusión GGA2-GFP, se pudo comprobar que la localización del anticuerpo de fusión EspF-Vgfp en el Golgi sólo ocurría si la célula expresaba la proteína de fusión GGA2-GFP, por lo que no existía una unión del anticuerpo de fusión EspF-Vgfp a las membranas del Golgi en ausencia de GGA2-GFP.

Estos resultados pudieron comprobarse en las mismas muestras mediante microscopía confocal (Fig. 15) lo que garantiza la colocalización de las señales de fluorescencia de la GFP y EspF-Vgfp. En estas imágenes, además de las señales de las fusiones EspF-Vgfp (rojo) y GGA2-GFP (verde), se incluyó una tinción específica de EPEC, con anticuerpo policlonal de conejo anti-int280_{EPEC}, que marca la proteína Intimina presente en la superficie de las bacterias, y como secundario un conjugado anti-IgG de conejo-Alexa 647 (Fig. 15; señal azul).

Finalmente, para obtener una prueba inequívoca de interacción directa entre el anticuerpo de fusión EspF-Vgfp y el antígeno GGA2-GFP se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación con el mAb anti-E-tag. Para ello se obtuvieron lisados celulares clarificados (sin núcleos ni bacterias) procedentes de células HeLa expresando la proteína de fusión GGA2-GFP e infectadas con EPEC/pEspFVgfp o EPEC/pEspFVamy (como en el experimento anterior; ver Materiales y métodos). Como control adicional, se obtuvo un lisado celular de un cultivo de células HeLa no transfectadas con la proteína de fusión GGA2-GFP (NT) e infectadas con EPEC/pEspFVgfp. Estos extractos proteicos se incubaron con mAb anti-E-tag acoplado covalentemente a una resina de Sefarosa con proteína G. Se recuperó la resina mediante centrifugación suave, se lavó para eliminar proteínas no unidas por el anticuerpo anti-E-tag, y se eluyeron con pH ácido (0.1 M glicina; pH 2.5) las proteínas inmunoprecipitadas (IP) por el mAb anti-E-tag. La presencia de los anticuerpos de fusión EspF-Vgfp y EspF-Vamy y la proteína de fusión GGA2-GFP en el resultado de la inmunoprecipitación se analizó mediante Western blots revelados con mAb anti-E-tag o anti-GFP (Fig. 16A).

Como se observa, los anticuerpos de fusión EspF-Vgfp y EspF-Vamy se encuentran en la proteína IP con anti-E-tag a niveles similares (Fig. 16A). Sin embargo, la proteína de fusión GGA2-GFP sólo co-inmunoprecipitó junto con el anticuerpo de fusión EspF-Vgfp (Fig. 16A, carril 1) y no con el anticuerpo de fusión EspF-Vamy (carril 2). La presencia de las proteínas en los lisados celulares empleados se reveló mediante Western blots con anti-E-tag o anti-GFP (Fig. 16B). Un anticuerpo anti- β -tubulina se utilizó como control interno de carga en los lisados. Por lo tanto, los experimentos de co-inmunoprecipitación antígeno-anticuerpo, junto con los de colocalización *in vivo*, demuestran que los anticuerpos de fusión EspF- V_{HH} inyectados por el SST3 de EPEC son funcionales en el interior de una célula eucariótica y son capaces de reconocer a su antígeno.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio están descritas en la *Tabla 1*. Las bacterias se crecieron a 37°C con aireación en medio Luria-Bertani (LB) o en Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM), suplementado con ampicilina (150 $\mu\text{g ml}^{-1}$) o tetraciclina (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), cuando era necesario para la selección de plásmidos^{31,32}. Para

inducir las cepas se pusieron inóculos en LB con el antibiótico adecuado y se les dejó crecer durante una noche y al día siguiente se diluyeron 1:50 en DMEM y se dejaron creciendo a 37°C con agitación hasta una $DO_{600} = 0.5$, en ese punto se les añadió una concentración 0.1 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se dejó durante otras 4 horas induciendo en las mismas condiciones de crecimiento^{31,32}.

5

Plásmidos

Los plásmidos usados en este trabajo se resumen en la Tabla 1. Los detalles de la construcción de los plásmidos más relevantes en este trabajo se describen a continuación. Se emplearon técnicas estándar de manipulación y amplificación de DNA³³. El plásmido pEspFVamy (Tabla 1) es un derivado de pSA10³⁴, un vector que contiene un sitio múltiple de clonaje bajo el control del promotor *Ptac*. En este sitio se clonó un fragmento de 549 pb que codificaba el V_{HH} anti-amilasa (Vamy) fusionado a la señal de secreción tipo III de 20 aminoácidos de espF y marcado con una secuencia de 6 histidinas y un epítipo E en el extremo 3'. Este fragmento fue amplificado mediante PCR de fusión de dos fragmentos diferentes. Uno de ellos, la señal de secreción de EspF, fue amplificado a partir de el ADN genómico de la cepa EDL933stx mediante los cebadores R1-Xb-SD-EspF y SfiI-espF (Tabla 2) dando lugar a un fragmento de 119 pb. El otro fragmento empleado en la fusión, de 517 pb, es el correspondiente a Vamy con los epítopos 6xhis y E en el extremo 3', que fue amplificado a partir del plásmido pEHLYA4SD-Vamy (Tabla 1) utilizando los cebadores SfiI-Vamy y RI-Stop-E (Tabla 2). Ambos fragmentos se fusionaron mediante PCR empleando los oligos R1-Xb-SD-EspF y RI-Stop-E (Tabla 2) para la amplificación. El producto final de fusión (de 560 pb) se digirió EcoRI y se insertó en el mismo sitio de restricción del pSA10 seleccionando la orientación que situaba al gen bajo en control del promotor *Ptac*.

El plásmido pEspFVgfp se obtuvo sustituyendo mediante la digestión SfiI-NotI, el segmento codificante de Vamy del plásmido pEspFVamy por el segmento codificante de Vgfp. El segmento Vgfp se obtuvo a partir del plásmido pcAbGFP4 (cedido por el Dr. Serge Muyldermans, VIB, Bruselas) mediante PCR con los cebadores Vhh-sfiI2 y Vhh-NotI2 (Tabla 2). El fragmento amplificado fue digerido con SfiI y NotI y un fragmento de 358 pb digerido se ligó con T4 ligasa al esqueleto vector pEspFVamy sin el fragmento Vamy (~4.3 kb).

Los plásmidos pEspF-bla y pEspF-Vamy-bla son derivados del pCX340³¹, vector empleado para realizar fusiones a la β -lactamasa TEM (*blaM*) sin péptido señal (Tabla 1). En el primero, pEspF-bla, contiene la señal N-terminal de EspF (SS) fusionada a la β -lactamasa. La SS de EspF se amplificó desde el ADN genómico de la EDL933stx con los oligonucleótidos NdeI-espF y EcoRI-espF (Tabla 2) dando lugar a un fragmento 83 pb. Por otro lado, se amplificó el segmento codificante de la β -lactamasa desde pCX340 con los cebadores EcoRI-TEM y BamHI-Tetra (Tabla 2), que dieron lugar a un fragmento de 1,2 kb. Estos fragmentos se fusionaron mediante PCR dando lugar a un fragmento de 1.3 kb que, tras digestión con NdeI y BamHI, se ligó al esqueleto del vector pCX340 previamente digerido con NdeI y BamHI. En el plásmido pCX340 se insertó el híbrido EspF₂₀-Vamy que fue amplificado mediante PCR del plásmido pEspF-Vamy (Tabla 1) utilizando los cebadores NdeI-espF y EcoRI-Vamy-espF (Tabla 2) y posteriormente digerido con NdeI y EcoRI y ligado al esqueleto del vector pCX340, también digerido por estas enzimas.

Preparación de muestras de proteínas, electroforesis y Western blot

Los extractos celulares totales fueron preparados de células de *E. coli* EPEC o EHEC recogidas mediante centrifugación (4000 g, 5 min) a partir de 1 ml de cultivo inducido y resuspendidas en 100 μ l de PBS. Tras la resuspensión se añadió a la mezcla el mismo volumen de buffer de carga SDS-PAGE 2X (ver más adelante). Las muestras se hirvieron durante 10 minutos, se sonicaron brevemente (5 segundos; Labsonic B Braun) para disminuir la viscosidad y finalmente se centrifugaron (14000 g, 5 min) para separar los restos de peptidoglicano antes de cargar en los pocillos de los geles de acrilamida-SDS (SDS-PAGE). Se emplearon métodos estándar para la electroforesis y detección por Western blot³³.

Los sobrenadantes obtenidos de la inducción en las cepas EPEC y EHEC transformadas con los diferentes plásmidos se filtraron siempre con filtros de PVDF (Millipore) con un poro de 0,22 μ m y se les añadió 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidor de serin-proteasas. Las muestras de los sobrenadantes se prepararon de dos maneras para electroforesis. En una de ellas se precipitó 1 ml de sobrenadante con ácido tricloroacético (TCA; 10% p/v final) durante una hora en hielo, las proteínas precipitadas se recuperaron mediante la centrifugación (14000 g, 15 min), los pellets obtenidos se lavaron con acetona fría (-20°C) y volvieron a centrifugarse (14000 g, 15 min) y el pellet resultante se resuspendió en 40 μ l de TrisHCl 250 mM (pH 7.5), SDS 2%, y después se le añadieron 40 μ l de tampón SDS-PAGE 2X. Alternativamente, los sobrenadantes filtrados se mezclaron directamente con el tampón de carga SDS-PAGE 2X. En ambos casos se hirvieron durante 10 minutos antes de cargar los geles SDS-PAGE.

60

Los geles SDS-PAGE de poliacrilamida (acrilamida a bisacrilamida 29:1 (w/w); BioRad) se hicieron utilizando 4% en el gel concentrante y 10 ó 12% en el gel separador y se empleó un sistema de electroforesis Miniprotean III (BioRad). El tampón de carga SDS-PAGE se elaboró con la siguiente composición (1X): TrisHCl 60 mM (pH 6.8), SDS 1% (p/v), glicerol 5% (v/v), azul de bromofenol 0.005% (p/v) y 2-mercaptoetanol 1% (v/v). Las proteínas presentes en los geles de acrilamida se tiñeron con azul de Coomassie o se emplearon para Western blot para detección con anticuerpos específicos, para lo que se transfirieron a una membrana PVDF (Immobilon-P, Millipore) usando un equipo de transferencia en semi-seco (Bio-Rad) y los protocolos estándar. Para la inmunodetección de las proteínas con epítipo E, las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anti-E-tag mAb-conjugado con peroxi-

65

ES 2 322 116 B1

dasa (POD) (1:5000) (GE Amersham Biosciences). La proteína GroEL de *E. coli* fue detectada con un anticuerpo anti-GroEL-POD conjugado (1:5000) (Sigma). La proteína (3-lactamasa fue detectada con anti- β -lactamasa (1:1000) La proteína β -lactamasa fue detectada con anti- β -lactamasa (1:1000) (QED Bioscience) monoclonal de ratón como anticuerpo primario y anti-IgG de ratón-POD (1:5000) (Sigma) como anticuerpo secundario. La proteína GFP fusionada a GGA2 fue detectada con el anticuerpo anti-GFP (1:1000) (Roche) monoclonal de ratón como anticuerpo primario y anti-IgG de ratón-POD (1:5000) (Sigma) como anticuerpo secundario. La proteína β -tubulina con anticuerpo mAb anti-(3-tubulina (cedido por Dr. Francisco García del Portillo, CNB-CSIC) y anti-IgG de ratón-POD (Sigma) como anticuerpo secundario. Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada al 3% en PBS, lavadas con PBS con 0.1% Tween-20, y reveladas con luminol y agua oxigenada (H_2O_2) como se ha descrito en³⁵.

Ensayos de ELISA

Las condiciones generales de ELISA se han descrito anteriormente³⁵. Placas de inmuoadsorción de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) se recubrieron con diferentes antígenos a $10 \mu\text{g/ml}$ en PBS. Los antígenos fueron: α -amilasa (Sigma), la proteína verde fluorescente GFP (Upstate) y seroalbúmina bovina (BSA, Roche). Se bloqueó 2 h con leche desnatada al 3% en PBS, después como anticuerpo primario se utilizaron los sobrenadantes con los V_{HH} secretados o el resultado de la purificación de éstos, y como anticuerpo secundario se utilizó el anti-E-tag mAb-POD (GE Amersham Bioscience) 1:2000 en leche al 3%. Después de revelar con o-fenilenodiamino (OPD, Sigma) y H_2O_2 (Sigma) la absorbancia a 490 nm fue determinada en un lector de placas (Microplate reader, BioRad).

Purificación de anticuerpos V_{HH}

200 ml de sobrenadante de medio de cultivo resultantes de la inducción de la cepa EPEC con los plásmidos pespFVamy o pespFVgfp se equilibraron para contener PBS 1X y se incubaron toda la noche a 4°C con la resina de afinidad metálica (Talon, Clontech), tras la incubación la resina se lavó cuatro veces con PBS conteniendo 5 mM de Imidazol (10 ml cada vez) y se eluyó en alícuotas de 1 ml con PBS conteniendo 100 mM de imidazol (10 alícuotas). Los anticuerpos así eluidos se almacenaron a 4°C . Para analizar el contenido de proteínas de las alícuotas se añadió tampón de carga SDS-PAGE 2X a $10 \mu\text{l}$ de cada alícuota y se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot.

Ensayo de solubilidad

El sobrenadante de la inducción de los V_{HH} anti-GFP y anti-amilasa se centrifugó a alta velocidad (100.000 g) a 4°C durante 1 hora en una ultracentrífuga (Beckman). Los pellets resultantes se resuspendieron para el mismo volumen final que el sobrenadante, y una muestra de cada se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot.

Cultivos celulares *in vitro* y ensayos de transfección e infección

Las células HeLa se crecieron en DMEM, suplementado con suero fetal bovino al 10% y 2 mM de glutamina, a 37°C y con 5% CO_2 ³². Las células se sembraron en cubreobjetos redondos de 13 mm de diámetro colocados en placas de 6 cm de diámetro (8 cubreobjetos por placa) con una densidad de 15×10^6 células por placa 20 h antes de la transfección, se transfectaron con el método del fosfato cálcico³⁶, usando $6 \mu\text{g}$ de plásmido por placa, 22 horas después se retiró el medio con los cristales de fosfato cálcico y se lavó 3 veces con PBS, después se trasladaron los cubreobjetos a una placa de 24 pocillos, donde se puso 1 cubreobjetos por pocillo con 1 ml de medio completo en cada uno de ellos, una hora después se cogieron $20 \mu\text{l}$ de un cultivo bacteriano con una $\text{DO}_{600} \approx 2.5$ (crecido toda la noche) y se añadieron a cada uno de los pocillos, se dejó que la infección comenzase durante 1 hora y 15 min para dejar tiempo para la adhesión de las bacterias a la superficie de las células, en ese punto se añadió IPTG para una concentración final de 0.1 mM y se dejó proseguir la infección durante 3.5 horas más.

Translocación de híbridos con β -lactamasa

Se emplearon los métodos descritos en³¹. Cultivos de EPEC crecidos durante toda la noche se diluyeron 1:100 en 5 ml de DMEM completo y se incubaron a 37°C en un incubador con una atmósfera 5% CO_2 durante 3.5 horas (preactivación) en un tubo Falcon de 50 ml sin agitación. Las células HeLa, crecidas en portaobjetos con celdillas (Falcon) en medio DMEM completo, se infectaron con $50 \mu\text{l}$ de un cultivo de bacterias preactivadas ($\text{D.O.}_{600 \text{ nm}} \sim 0.5$) y a la vez se añadió IPTG 1 mM concentración final y se dejó incubando 90 min más, después se quitó el medio con bacterias y se lavó 3 veces con Hank's balance salt solution (HBSS), al quitar el tercer lavado se puso $200 \mu\text{l}$ de HBSS y se añadieron $40 \mu\text{l}$ del sustrato para la β -lactamasa CCF2/AM (K1024, Invitrogen), las células se incubaron con esta mezcla durante 2.5 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente se quitaron las celdillas de los portaobjetos, se lavaron 3 veces con HBSS y se pusieron los cubreobjetos para su análisis en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 usando un juego de filtros UV-2^a (330-380 nm excitación). Las imágenes se tomaron con una cámara Nikon Digital DXM1200.

Microscopía de inmunofluorescencia

Se emplearon los métodos descritos en³². Después de la infección las monocapas de células HeLa se lavaron 3 veces con PBS y se dejaron fijando con formaldehído al 3.6% (v/v) 20 minutos, después se lavaron 3 veces con PBS. Para la permeabilización se incubaron los cubreobjetos con 0.1% Tritón X-100 (Sigma) en PBS durante 20 minutos. Los anticuerpos se diluyeron en 10% suero de cabra en PBS, los anticuerpos primarios se incubaron con

ES 2 322 116 B1

los cubreobjetos durante 1 hora, tras la incubación se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron 45 minutos con los anticuerpos secundarios, después se lavaron de nuevo 3 veces y se montaron con medio de montaje (Vectashield) en los portaobjetos. Los anticuerpos y reactivos usados fueron: anti-int280_{EPEC} (policlonal de conejo) y anti-Etag m-Ab (GE Amersham Bioscience) se utilizaron con diluciones 1:400 y 1:100 respectivamente como anticuerpos primarios. Como anticuerpos secundarios se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG ratón conjugado con Alexa 594 (Molecular Probes), que emite en rojo, y cabra-anti-IgG conejo conjugado con Alexa 647 (Molecular Probes), que emite en rojo lejano y que se transforma a azul con el software del microscopio confocal. Ambos se utilizaron con una dilución 1:500. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 y un sistema confocal (Radiant 2100 system BioRad) complementado con una microscopio invertido (Zeiss Axiovert 200).

Ensayos de inmunoprecipitación

Las células HeLa se crecieron en placas de 150 mm de diámetro, al día siguiente con una confluencia del 70% se transfectaron con 30 μ g de DNA (pGFP-GGA2) por el método del fosfato de calcio, 24 h después se infectaron con EPEC (conteniendo los plásmidos indicados) como se ha descrito, después se rasparon las células y se recogieron en un buffer para su lisis de manera mecánica como está descrito en ³⁷. El resultado de la lisis se centrifugó a 3000 g x 15 min para eliminar células no rotas, núcleos y bacterias. Al sobrenadante de esta centrifugación (considerado lisado celular) se añadió 40 μ l de resina Sefarosa-proteína G (Sigma) que contenía anticuerpo mAb anti-E-tag unido covalentemente mediante tratamiento con el agente entrecruzante DMP (Dimethyl Pimelimidate Dihydrochloride, Sigma), siguiendo el protocolo recomendado por (GE Amersham Bioscience). Tras 16 horas de unión a 4°C en un agitador orbital, la resina se recuperó mediante centrifugación (2000 g, 1 min) y se lavó 3 veces con tampón fosfato sódico 200 mM (pH 8.2). Finalmente la proteína unida a la resina con anti-E-tag se eluyó con 60 μ l Glicina 0.1 M pH 2.8 (10 min a RT) y tras eliminar la resina con centrifugación, el sobrenadante se equilibró con 30 μ l de tampón fosfato pH 8.2 y se mezcló con tampón SDS-PAGE para realizar Western blot.

TABLA 1

Cepas bacterianas y plásmidos

Nombre	Descripción y principales características	Referencias
Cepas		
EDL933 stx	EHEC O157:H7 $stx1 stx2$	ATCC; Gad Frankel laboratory
E2348/69	EPEC O127:H6	Mc. Daniel et al. (1995)
EDL933 $\Delta escN::Km$	Mutante $\Delta escN$; KmR	Garmendia et al. (2004)
E2348/69 $\Delta escF::Km$	Mutante $\Delta escF$; KmR	Wilson et al. (2001)
Plásmidos		
pEHLA4SD-Vamy	Derivado del pUC19 (ApR) que contiene una fusión del Vamy a 6xhis E-tag y el dominio C-terminal de hlyA	Luis A. Fernández: colección de laboratorio
pCAbGFP 4	pHEN6c (ApR) codificando V _{HH} anti-GFP	Serge Muyldermans: colección de laboratorio
pSA10	Derivado del pKK177-3 (ApR) que contiene un lacI ^q	Schlosser-Silverman et al. (2000)
pEspFVamy	Un derivado del pSA10 (ApR) que	Este trabajo

ES 2 322 116 B1

		codifica 20aa de espF fusionados a V _{HH} anti- α -amilasa con 6xhis and E-tag	
5	pEspFVgfp	Un derivado de pSA10 (ApR) que codifica 20aa de espF fusionado a un V _{HH} anti-GFP con 6xhis y E-tag	Este trabajo
10	p Δ signVgfp	Un derivado de pEspFVgfp (ApR) con una delección en la señal espF	Este trabajo
15	pCX340	Un derivado de pBR322 TcR utilizado para generar fusiones de genes a bla (β -lactamasa)	Charpentier & Oswald (2004)
	pEspF-bla	Un derivado de pCX340 (TcR) con la señal de espF (20 aa) fusionada a β -lactamasa	Este trabajo
20	pEspF-Vamy-bla	Un derivado de pCX340 (TcR) con el híbrido espF(20aa)-Vamy fusionado a la β -lactamasa	Este trabajo
25	pGGA2-GFP	Vector de expression eucariota con una proteína de golgi, GGA2, fusionada en el extremo N-terminal a GFP	R. Mattera et al. (2003)

TABLA 2
Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia nucleotídica (5'-3')
40 RI-XB-SD-espF	CCGGAATTCTCTAGAAAGAGGCATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTA
SfiI-espF	CTGCACCTGAGCCATGGCCGGCTGGGCCGCTGCGATACCTACAAGCTGCCGCCCTA
SfiI-Vamy	CTTGTAGGTATCGCAGCGGCCAGCCGGCCATGGCTCAGGTGCAGCTG
45 RI-stop-E	CCGGAATTCTCATTAGCCGGTTCACGCGATCCGGATACGGCAC
Vhh-SfiI2	GTCTCGCAACTGCCGCCAGCCGGCCATGGCTCAGGTGCAGCTGGTGA
Vhh-NotI2	GGACTAGTGCAGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT
NdeI-espF	CCGGATCCATATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTGCTTCT
50 EcoRI-EspF	GGTGCGAATTCGCTGCGATACCTACAAGCTGCCGCCCTA
EcoRI-TEM	GCGGCAGCTTGTAGGTATCGCAGCGAATTCGCACCCAGAAACGCTGGTGA
BamHI-tetra	ATGCGTCCGGCGTAGAGGATCCACAGGACGGGT
55 NdeI-espF-Vamy	GGGAATCCATATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTGCT
EcoRI-Vamy-espF	CCGGAATTCGCGCCGGTTCAGCGGATCCGGATA
60 Δ sign-EcoRI	CCGGAATTCTCTAGAAAGAGGCATAAATTATGGCTCAGGTGCAGCTGG

65

Bibliografía

1. **Fernández**, L.A. Prokaryotic expression of antibodies and affibodies. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 364-373 (2004).
- 5 2. **Laffly**, E. & **Sodoyer**, R. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after. *Hum Antibodies* **14**, 33-55 (2005).
3. **Wu**, A.M. & **Senter**, P.D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* **23**, 1137-1146 (2005).
- 10 4. **Holliger**, P. & **Hudson**, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**, 1126-1136 (2005).
- 15 5. **Hoogenboom**, H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **23**, 1105-1116 (2005).
6. **Muyldermans**, S., **Cambillau**, C. & **Wyns**, L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci* **26**, 230-235. (2001).
- 20 7. **Reff**, M.E. & **Heard**, C. A review of modifications to recombinant antibodies: attempt to increase efficacy in oncology applications. *Crit Rev Oncol Hematol* **40**, 25-35. (2001).
8. **Noel**, D. *et al.* High *in vivo* production of a model monoclonal antibody on adenoviral gene transfer. *Hum Gene Ther* **13**, 1483-1493 (2002).
- 25 9. **Lobato**, M.N. & **Rabbitts**, T.H. Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends Mol Med* **9**, 390-396 (2003).
10. **Pawelek**, J.M., **Low**, K.B. & **Bermudes**, D. Bacteria as tumour-targeting vectors. *Lancet Oncol* **4**, 548-556 (2003).
- 30 11. **Dooley**, H., **Flajnik**, M.F. & **Porter**, A.J. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Mol Immunol* **40**, 25-33. (2003).
- 35 12. **Muyldermans**, S. Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol* **74**, 277-302. (2001).
13. **Kaper**, J.B., **Nataro**, J.P. & **Mobley**, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 123-139 (2004).
- 40 14. **Spears**, K.J., **Roe**, A.J. & **Gally**, D.L. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 187-202 (2006).
15. **Cornelis**, G.R. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811-825 (2006).
- 45 16. **Galan**, J.E. & **Wolf-Watz**, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**, 567-573 (2006).
17. **Garmendia**, J., **Frankel**, G. & **Crepin**, V.F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**, 2573-2585 (2005).
- 50 18. **Chen**, H.D. & **Frankel**, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 83-98 (2005).
19. **Chen**, L.M., **Briones**, G., **Donis**, R.O. & **Galan**, J.E. Optimization of the delivery of heterologous proteins by the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion system for vaccine development. *Infect Immun* **74**, 5826-5833 (2006).
- 55 20. **Konjufca**, V., **Wanda**, S.Y., **Jenkins**, M.C. & **Curtiss**, R., 3rd A recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* vaccine encoding *Eimeria acervulina* antigen offers protection against *E. acervulina* challenge. *Infect Immun* **74**, 6785-6796 (2006).
- 60 21. **Wiedig**, C.A., **Kramer**, U., **Garbom**, S., **Wolf-Watz**, H. & **Autenrieth**, I.B. Induction of CD8+ T cell responses by *Yersinia* vaccine carrier strains. *Vaccine* **23**, 4984-4998 (2005).
- 65 22. **Rüssmann**, H. & **Pantel**, K. "One size fits it all": translocation of foreign antigens by *Yersinia* type III secretion system (TTSS) leads to concomitant CD4 and CD8 T-cell priming. *Int J Med Microbiol* **294**, 313-317 (2004).

23. **Rüssmann, H. et al.** Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. *Infect Immun* **71**, 3463-3472 (2003).
24. **Rüssmann, H.** *Yersinia* outer protein E, YopE. A versatile type III effector molecule for cytosolic targeting of heterologous antigens by attenuated Salmonella. *Adv Exp Med Biol* **529**, 407-413 (2003).
25. **Evans, D.T. et al.** Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the Salmonella type III secretion antigen delivery system. *J Virol* **77**, 2400-2409 (2003).
26. **Rüssmann, H. et al.** Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J Immunol* **167**, 357-365 (2001).
27. **Rüssmann, H. et al.** Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. *Science* **281**, 565-568 (1998).
28. **Kotton, C.N. et al.** Safety and immunogenicity of attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the Salmonella Type III secretion system. *Vaccine* **24**, 6216-6224 (2006).
29. **Nishikawa, H. et al.** *In vivo* antigen delivery by a *Salmonella typhimurium* type III secretion system for therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest* **116**, 1946-1954 (2006).
30. **McDaniel, T.K. & Kaper, J.B.** A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**, 399-407 (1997).
31. **Charpentier, X. & Oswald, E.** Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J Bacteriol* **186**, 5486-5495 (2004).
32. **Garmendia, J. et al.** TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* **6**, 1167-1183 (2004).
33. **Ausubel, F.M. et al.** Short Protocols in Molecular Biology, Edn. Third Edition. (John Wiley & Sons, Inc., New York; 1997).
34. **Schlosser-Silverman, E., Elgrably-Weiss, M., Rosenshine, I., Kohen, R. & Altuvia, S.** Characterization of *Escherichia coli* DNA lesions generated within J774 macrophages. *J Bacteriol* **182**, 5225-5230 (2000).
35. **Jurado, P., Ritz, D., Beckwith, J., de Lorenzo, V. & Fernández, L.A.** Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **320**, 1-10. (2002).
36. **Ausubel, F.M. et al.** Current Protocols in Molecular Biology. (John Wiley & Sons, New York; 1994).
37. **Gauthier, A., de Grado, M. & Finlay, B.B.** Mechanical fractionation reveals structural requirements for enteropathogenic *Escherichia coli* Tir insertion into host membranes. *Infect Immun* **68**, 4344-4348 (2000).
38. **Wilson, R.K., Shaw, R.K., Daniell, S., Knutton, S. & Frankel, G.** Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**, 753-762 (2001).
39. **Mattera, R., Arighi, C.N., Lodge, R., Zerial, M. & Bonifacino, J.S.** Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex. *Embo J* **22**, 78-88 (2003).

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo **caracterizado** porque presenta un sistema de secreción e inyección de proteínas tipo III (SST3) útil para la secreción extracelular y/o inyección de anticuerpos funcionalmente activos en células eucariotas y una construcción genética que comprende, al menos, una secuencia de ADN que contiene la secuencia codificante de la región señal de secreción (SS) SEC ID NO5, reconocida por un sistema SST3, unida o fusionada a una secuencia de ADN que contiene la secuencia codificante de un anticuerpo y que permite la expresión de dicho anticuerpo de fusión funcionalmente activo en su citoplasma y su secreción o inyección exterior.

2. Microorganismo según la reivindicación 1 donde dicho microorganismo es una bacteria Gram negativa.

3. Microorganismo según la reivindicación 2 donde la bacteria Gram negativa es una cepa de *Escherichia coli* enteropatogena (EPEC) y/o enterohemorrágica (EHEC).

4. Microorganismo según la reivindicación 1 donde el anticuerpo funcionalmente activo es un anticuerpo recombinante o minianticuerpo que mantiene al menos un dominio variable de inmunoglobulina donde residen las zonas de unión a antígenos, y que pertenece al siguiente grupo: Fab, F(ab')₂, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs).

5. Microorganismo según la reivindicación 4 donde el anticuerpo recombinante monodominio está constituido por un dominio variable de cadena pesada (VH), dominio variable de cadena ligera (VL), o sea un anticuerpo recombinante de camélidos (VHH), un anticuerpo recombinante de camélidos humanizados, un anticuerpo recombinante de otras especies camelizadas, un anticuerpo monodominio IgNAR de peces cartilagosos.

6. Microorganismo según la reivindicación 1 donde la secuencia de ADN codificante del anticuerpo es un anticuerpo monodominio dAb, preferentemente de tipo V_{HH}.

7. Construcción genética **caracterizada** porque comprende, al menos:

i) La SEC ID NO5, o

ii) Una secuencia de ADN que codifica para una secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 99%, 98%, 95%, 90%, o un 80% con la SEC ID NO: 6, y

iii) una secuencia nucleotídica codificante de un anticuerpo de interés.

y porque permite la expresión del anticuerpo de fusión en la célula.

8. Construcción genética según la reivindicación 7 donde secuencia codificante del anticuerpo de interés codifica para un anticuerpo de camélido, y más preferentemente es una secuencia que comprende cualquiera de las siguientes:

i) la SEC ID NO1

ii) la SEC ID NO3.

9. Anticuerpo de fusión **caracterizado** porque comprende cualquiera de estas secuencias:

i) SEC ID NO2

ii) SEC ID NO4.

10. Vector de expresión o plásmido que comprende la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8.

11. Uso de la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 o del vector de expresión según la reivindicación 10 para la obtención del microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

12. Procedimiento de obtención del microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 **caracterizado** porque comprende al menos la transfección o transformación del microorganismo con la construcción genética según las reivindicaciones 7-8 o con el vector de expresión según la reivindicación 10.

13. Uso del microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en un procedimiento biotecnológico de secreción y/o inyección de anticuerpos recombinantes funcionales de interés.

14. Uso del microorganismo según la reivindicación 13 **caracterizado** porque el anticuerpo recombinante pertenece al siguiente grupo: Fab, F(ab')₂, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs), preferentemente dAbs, y más preferentemente V_{HH} de camélidos.

ES 2 322 116 B1

15. Uso del microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la elaboración de un medicamento o composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades humanas, animales o de plantas.

5 16. Medicamento o composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades humanas, animales o de plantas que comprende el microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

10 17. Medicamento o composición terapéutica según la reivindicación 16 para el tratamiento de la angiogénesis tumoral, el cáncer, un proceso inflamatorio, inmunodepresión y trasplantes e infecciones virales, bacterianas y fúngicas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

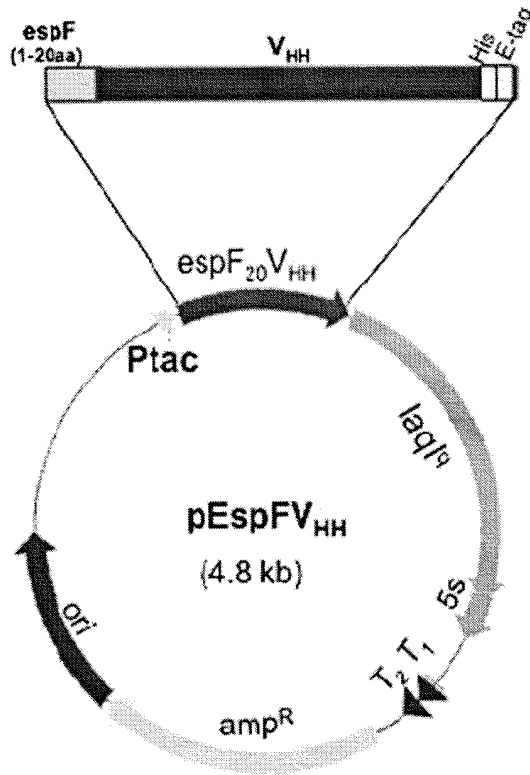


Figura 1

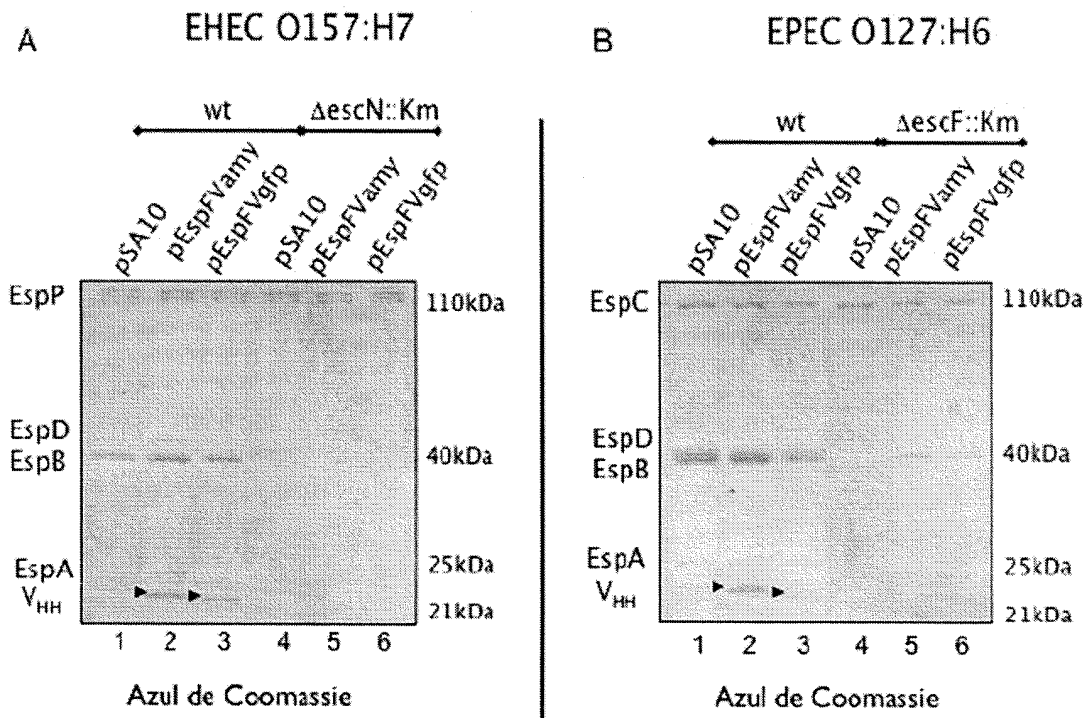


Figura 2

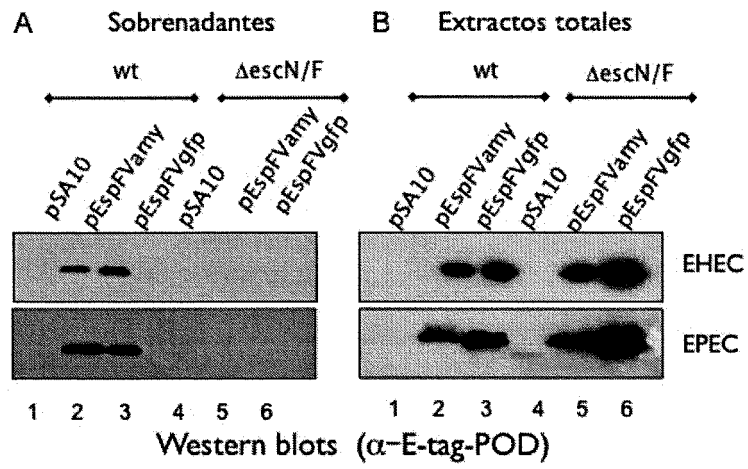


Figura 3

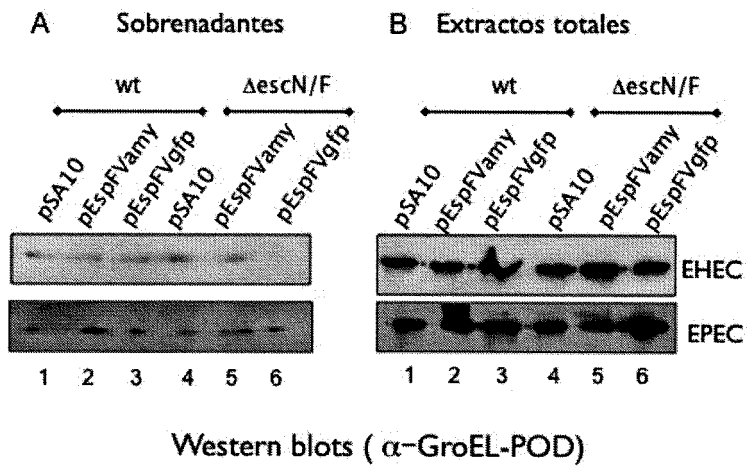


Figura 4

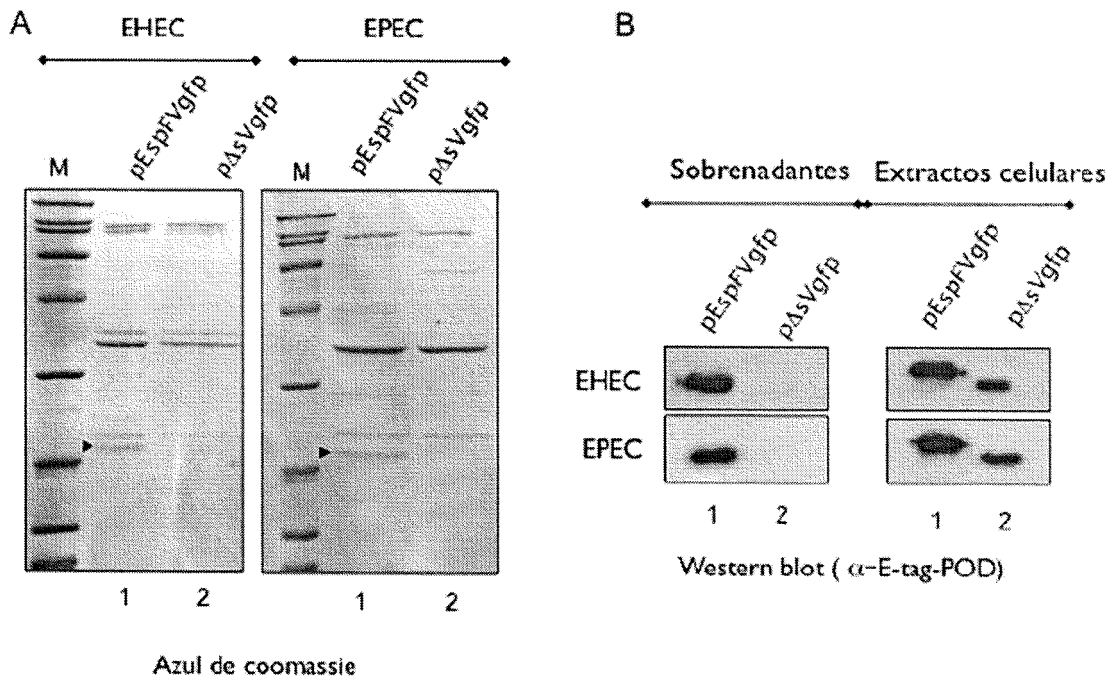


Figura 5

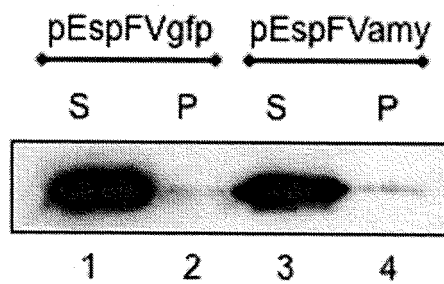


Figura 6

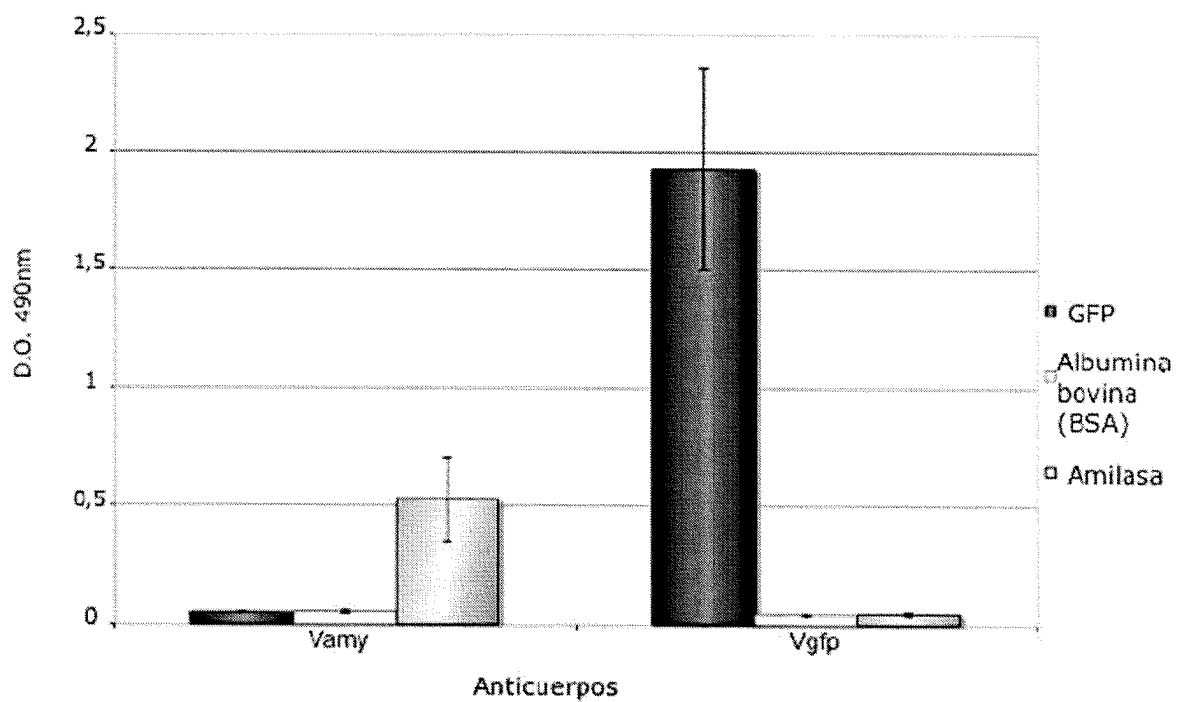


Figura 7

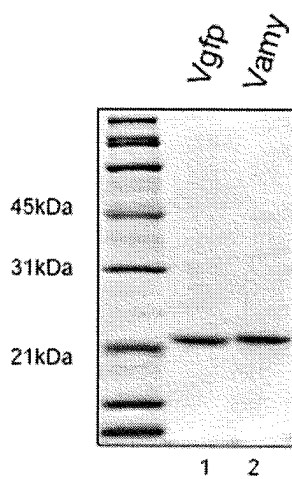


Figura 8

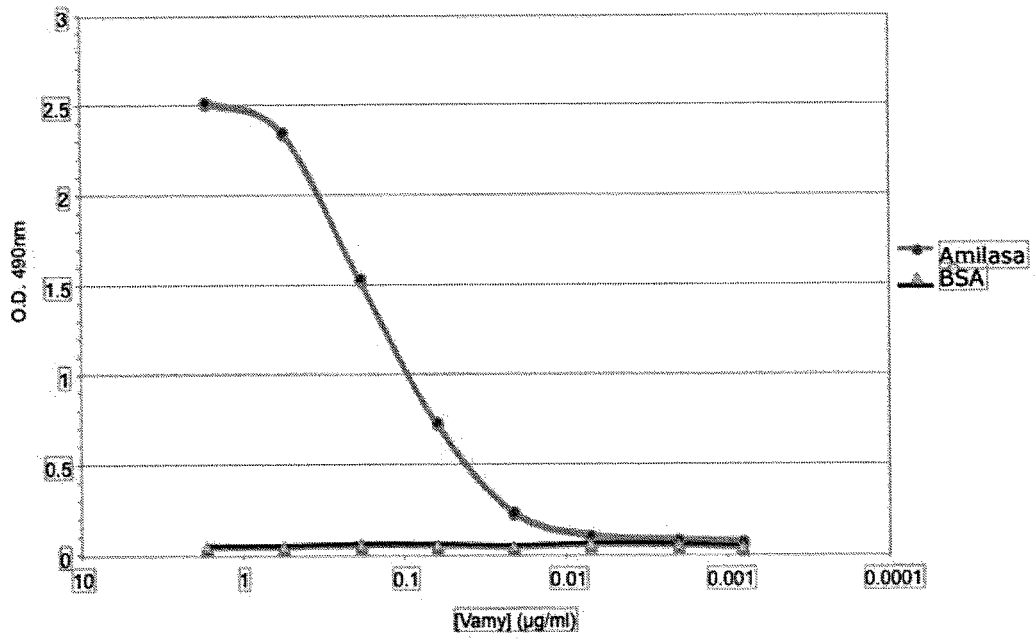


Figura 9

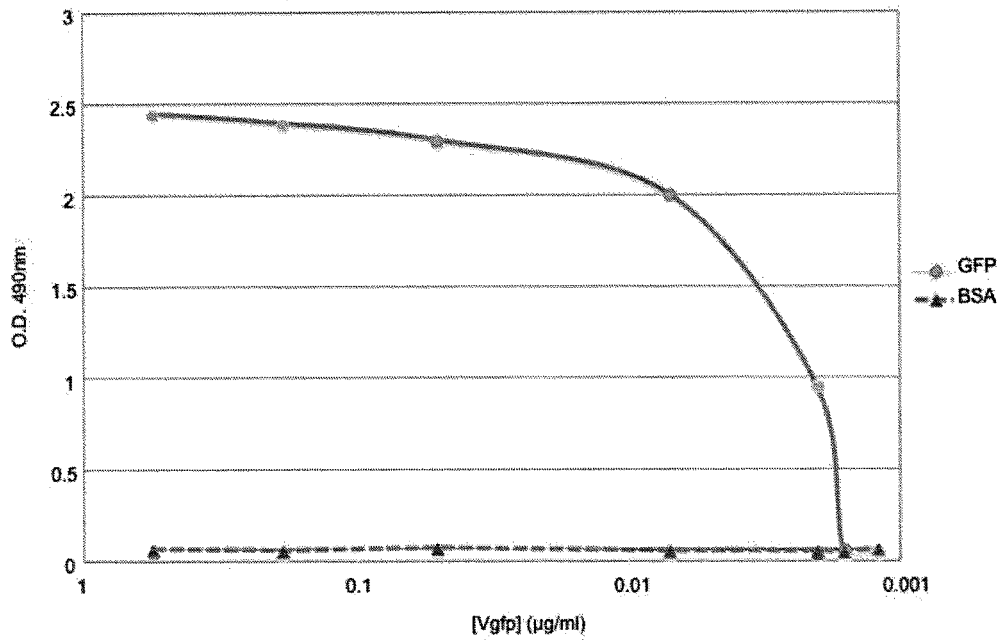


Figura 10

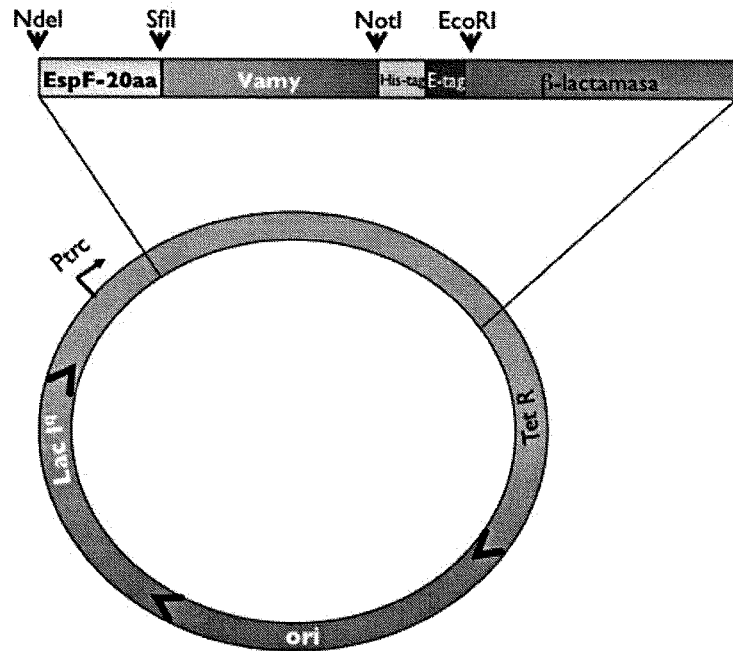


Figura 11

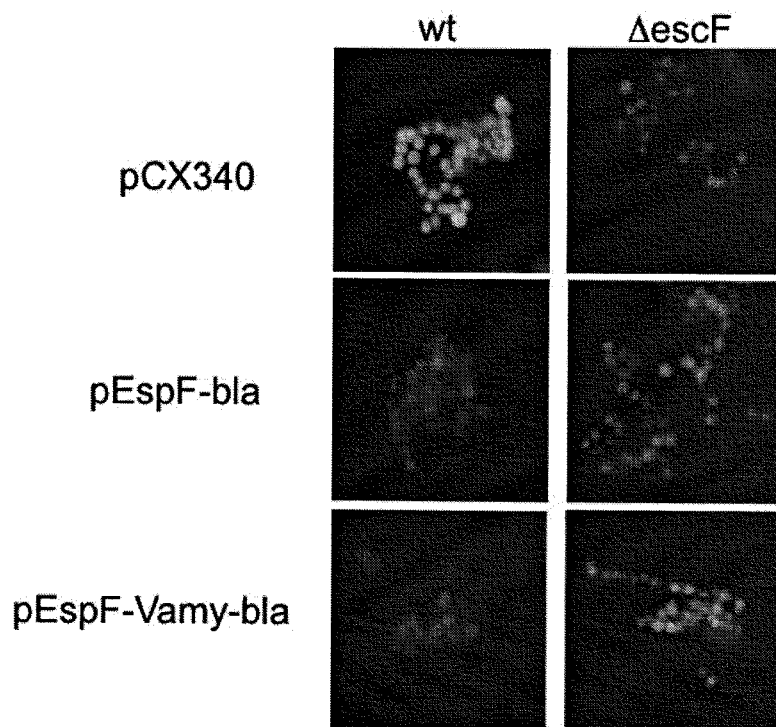


Figura 12

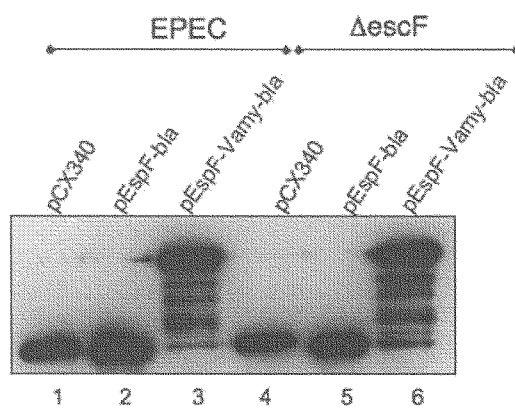


Figura 13

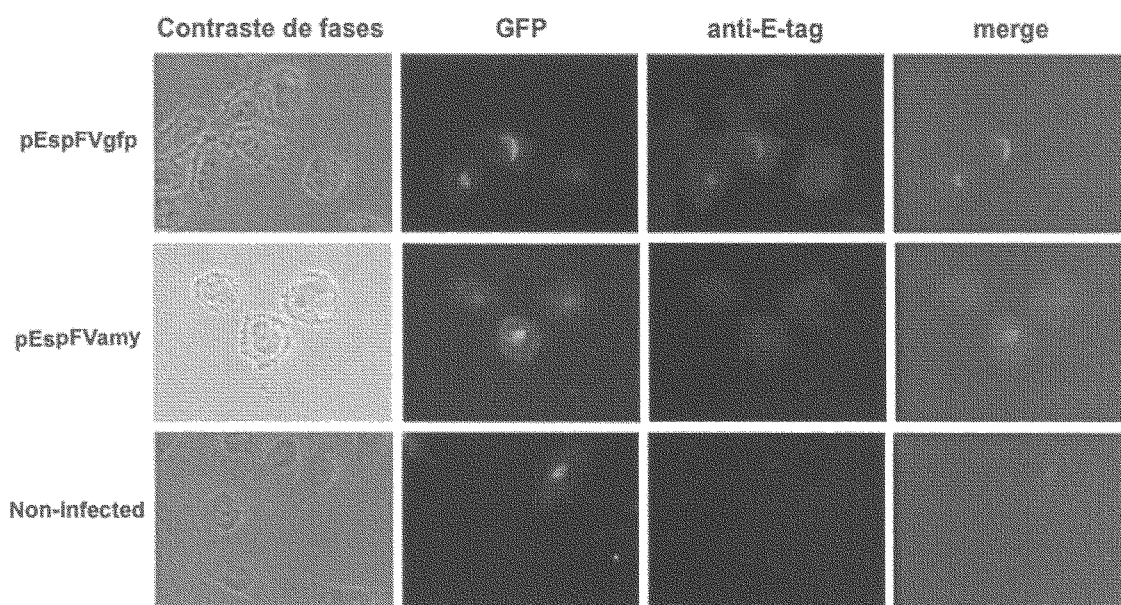


Figura 14

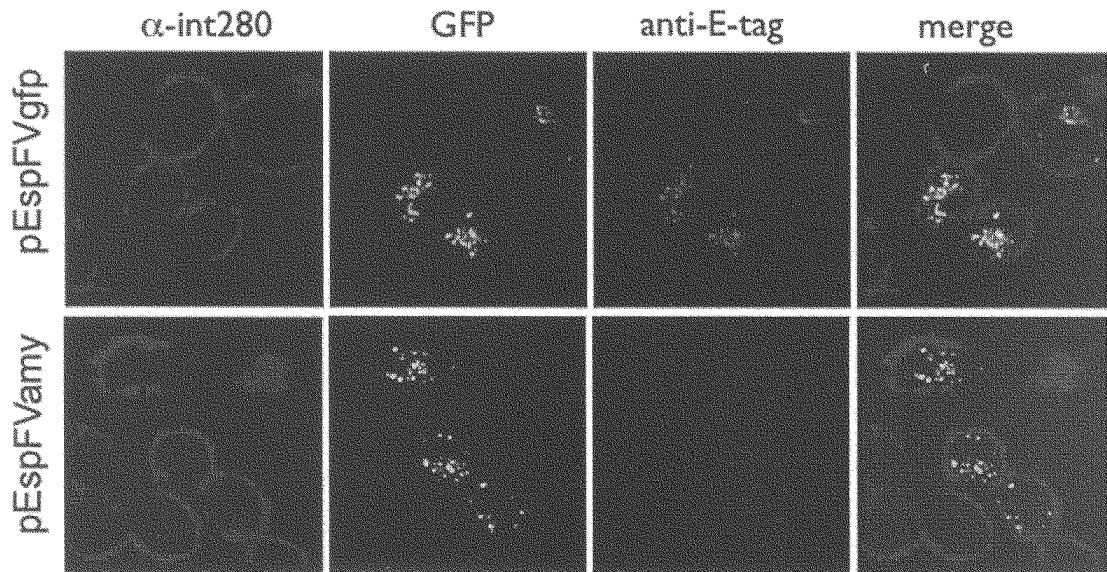


Figura 15

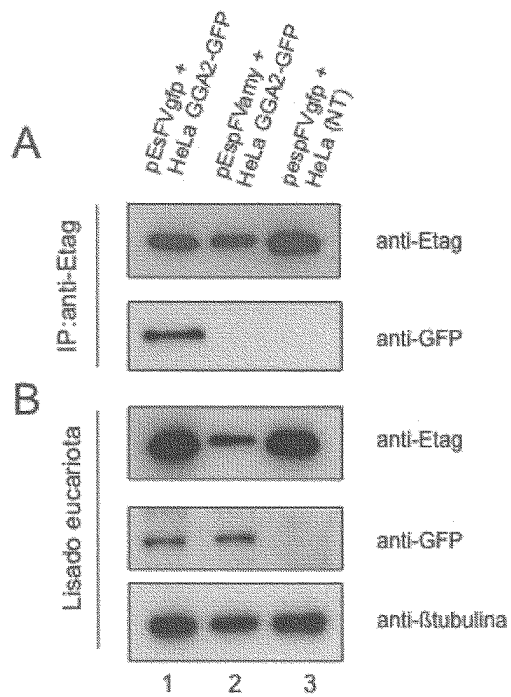


Figura 16

ES 2 322 116 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
- 5 <120> MICROORGANISMO PRODUCTOR DE ANTICUERPOS, ELEMENTOS NECESARIOS PARA SU OBTENCIÓN, ANTICUERPOS ASÍ PRODUCIDOS, COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS Y SUS APLICACIONES
- <130> SST3
- 10 <160> 12
- <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 585
- <212> DNA
- 20 <213> Artificial
- <220>
- <223> Fusión EspF-Vamy
- 25 <220>
- <221> CDS
- <222> (27)..(575)
- 30 <223> Fusión EspF-Vamy
- <220>
- <221> misc_feature
- 35 <222> (27)..(86)
- <223> Secuencia señal de secreción tipo III
- <220>
- 40 <221> misc_feature
- <222> (87)..(500)
- <223> Secuencia anticuerpo VHH anti-amilasa (Vamy)
- 45 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (501)..(518)
- 50 <223> Secuencia cola 6xHis
- <220>
- <221> misc_feature
- 55 <222> (519)..(575)
- <223> Secuencia E-tag
- 60
- 65

ES 2 322 116 B1

<400> 1

5	gaattotcta gaaagaggca taaatt atg ctt aat gga att agt aac gct gct Met Leu Asn Gly Ile Ser Asn Ala Ala	53
	1 5	
10	tct aca cta ggg cgg cag ctt gta ggt atc gca gcg gcc cag ccg gcc Ser Thr Leu Gly Arg Gln Leu Val Gly Ile Ala Ala Ala Gln Pro Ala 10 15 20 25	101
15	atg gct cag gtg cag ctg gtg gag tct tgg gga ggc tcg gtg cag gct Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Trp Gly Gly Ser Val Gln Ala 30 35 40	149
20	ggg ggg tct ctg aga ctc tcc tgc aca gcc cct gga ttc acc tcc aat Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Pro Gly Phe Thr Ser Asn 45 50 55	197
25	agc tgc cgc atg gac tgg tac cgc cag gct gca ggg aag cag cgc gag Ser Cys Arg Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Lys Gln Arg Glu 60 65 70	245
30	tgg gtc tca tct att agt act gat ggt cgc aca agc tat gca gac tcc Trp Val Ser Ser Ile Ser Thr Asp Gly Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser 75 80 85	293
35	gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aaa gac aaa gcc aag gac acg gtg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Lys Ala Lys Asp Thr Val 90 95 100 105	341
40	tat ctg caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc atc tat tac Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr 110 115 120	389
45	tgt gcc gtg agg acg aat ggg tat cgt ccg caa tct cac gaa ttt cgc Cys Ala Val Arg Thr Asn Gly Tyr Arg Pro Gln Ser His Glu Phe Arg 125 130 135	437
50	tac tgg ggc ccg ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc gca tcg Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ser 140 145 150	485
55	ggg gcc gcg tcg acg cac cat cac cat cac cat gct tcg acg ccc ggg Gly Ala Ala Ser Thr His His His His His His Ala Ser Thr Pro Gly 155 160 165	533
60	ggt gcg ccg gtg ccg tat ccg gat ccg ctg gaa ccg gcc taa Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Ala 170 175 180	575
65	tgagaattcc	585

<210> 2

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

ES 2 322 116 B1

<400> 2

```

5      Met Leu Asn Gly Ile Ser Asn Ala Ala Ser Thr Leu Gly Arg Gln Leu
      1           5           10           15

10     Val Gly Ile Ala Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val
      20           25           30

15     Glu Ser Trp Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
      35           40           45

20     Cys Thr Ala Pro Gly Phe Thr Ser Asn Ser Cys Arg Met Asp Trp Tyr
      50           55           60

25     Arg Gln Ala Ala Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Thr
      65           70           75

30     Asp Gly Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
      85           90           95

35     Ser Lys Asp Lys Ala Lys Asp Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
      100          105          110

40     Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Val Arg Thr Asn Gly
      115          120          125

45     Tyr Arg Pro Gln Ser His Glu Phe Arg Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Gln
      130          135          140

50     Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Ala Ala Ser Thr His His
      145          150          155          160

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

60     Asp Pro Leu Glu Pro Ala
      180

```

55 <210> 3

<211> 564

<212> DNA

<213> Artificial

60

<220>

<223> Fusión EspF-Vgfg

65

<220>

<221> CDS

ES 2 322 116 B1

<222> (27)..(554)

<220>

5 <221> misc_feature
<222> (27)..(86)
<223> Secuencia señal de secreción tipo III

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (87)..(479)
<223> Secuencia anticuerpo VHH anti GFP

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (480)..(497)
<223> Secuencia cola 6xHis

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (498)..(554)
<223> Secuencia E-tag

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 322 116 B1

<400> 3

5	gaattctcta gaaagaggca taaatt atg ctt aat gga att agt aac gct gct Met Leu Asn Gly Ile Ser Asn Ala Ala 1 5	53
10	tct aca cta ggg cgg cag ctt gta ggt atc gca gcg gcc cag ccg gcc Ser Thr Leu Gly Arg Gln Leu Val Gly Ile Ala Ala Ala Gln Pro Ala 10 15 20 25	101
15	atg gct cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gcc ttg gtg cag ccg Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro 30 35 40	149
20	ggg ggg tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc ccc gtc aat Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Val Asn 45 50 55	197
25	cgc tat agt atg agg tgg tac cgc cag gct cca ggg aag gag cgc gag Arg Tyr Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu 60 65 70	245
30	tgg gtc gcg ggt atg agt agt gct ggt gat cgt tca agt tat gaa gac Trp Val Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ser Tyr Glu Asp 75 80 85	293
35	tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac gac gcc agg aat acg Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Arg Asn Thr 90 95 100 105	341
40	gtg tat ctg caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtg tat Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr 110 115 120	389
45	tac tgt aat gtc aat gtg ggc ttt gag tac tgg ggc cag ggg acc cag Tyr Cys Asn Val Asn Val Gly Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln 125 130 135	437
50	gtc acc gtc tcc tca gcg gcc gca tcg ggg gcc gcg tcg acg cac cat Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Ala Ala Ser Thr His His 140 145 150	485
55	cac cat cac cat gct tcg acg ccc ggg ggt gcg ccg gtg ccg tat ccg His His His His Ala Ser Thr Pro Gly Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro 155 160 165	533
60	gat ccg ctg gaa ccg gcc taa tgagaattcc Asp Pro Leu Glu Pro Ala 170 175	564

<210> 4

<211> 175

60 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

65 <223> Synthetic Construct

ES 2 322 116 B1

<400> 4

5	Met 1	Leu	Asn	Gly	Ile 5	Ser	Asn	Ala	Ala	Ser 10	Thr	Leu	Gly	Arg	Gln 15	Leu	
10	Val	Gly	Ile	Ala 20	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala 25	Met	Ala	Gln	Val	Gln 30	Leu	Val	
15	Glu	Ser	Gly 35	Gly	Ala	Leu	Val	Gln 40	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu 45	Arg	Leu	Ser	
20	Cys	Ala 50	Ala	Ser	Gly	Phe	Pro 55	Val	Asn	Arg	Tyr	Ser 60	Met	Arg	Trp	Tyr	
25	Arg 65	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys 70	Glu	Arg	Glu	Trp	Val 75	Ala	Gly	Met	Ser	Ser 80	
30	Ala	Gly	Asp	Arg	Ser 85	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ser 90	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr 95	
35	Ile	Ser	Arg	Asp 100	Asp	Ala	Arg	Asn	Thr 105	Val	Tyr	Leu	Gln	Met 110	Asn	Ser	
40	Leu	Lys	Pro 115	Glu	Asp	Thr	Ala	Val 120	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Val 125	Asn	Val	Gly	
45	Phe	Glu 130	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly 135	Thr	Gln	Val	Thr	Val 140	Ser	Ser	Ala	Ala	
50	Ala 145	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser 150	Thr	His	His	His	His 155	His	His	His	Ala	Ser	Thr 160
55	Pro	Gly	Gly	Ala	Pro 165	Val	Pro	Tyr	Pro	Asp 170	Pro	Leu	Glu	Pro	Ala 175		

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

55 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia EspF20

60

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(60)

65

ES 2 322 116 B1

<400> 5

```

5       atg ctt aat gga att agt aac gct gct tct aca cta ggg cgg cag ctt      48
       Met Leu Asn Gly Ile Ser Asn Ala Ala Ser Thr Leu Gly Arg Gln Leu
       1                               5           10           15

       gta ggt atc gca
10      Val Gly Ile Ala
                20
    
```

<210> 6

15 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 6

```

25       Met Leu Asn Gly Ile Ser Asn Ala Ala Ser Thr Leu Gly Arg Gln Leu
       1                               5           10           15

       Val Gly Ile Ala
30                20
    
```

<210> 7

35 <211> 489
 <212> DNA
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> MutVgfp

45 <220>
 <221> CDS
 <222> (27)..(479)

<400> 7

```

50       gaattctcta gaaagaggca taaatt atg gct cag gtg cag ctg gtg gag tct      53
                Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
                1                               5

55       ggg gga gcc ttg gtg cag ccg ggg ggg tct ctg aga ctc tcc tgt gca      101
       Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
       10                               15           20           25

60       gcc tct gga ttc ccc gtc aat cgc tat agt atg agg tgg tac cgc cag      149
       Ala Ser Gly Phe Pro Val Asn Arg Tyr Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln
                30                               35           40
    
```

65

ES 2 322 116 B1

	gct cca ggg aag gag cgc gag tgg gtc gcg ggt atg agt agt gct ggt	197
	Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly	
	45	50
5	gat cgt tca agt tat gaa gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc	245
	Asp Arg Ser Ser Tyr Glu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser	
	60	65
10	aga gac gac gcc agg aat acg gtg tat ctg caa atg aac agc ctg aaa	293
	Arg Asp Asp Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys	
	75	80
15	cct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt aat gtc aat gtg ggc ttt gag	341
	Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val Asn Val Gly Phe Glu	
	90	95
20	tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc gca tcg	389
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ser	
	110	115
25	ggg gcc gcg tcg acg cac cat cac cat cac cat gct tcg acg ccc ggg	437
	Gly Ala Ala Ser Thr His His His His His His Ala Ser Thr Pro Gly	
	125	130
30	ggt gcg ccg gtg ccg tat ccg gat ccg ctg gaa ccg gcc taa	479
	Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Ala	
	140	145
	150	
	tgagaattcc	489
35	<210> 8	
	<211> 150	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Synthetic Construct	
45	<400> 8	
	Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro	
	1	5
	10	15
50	Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Val Asn	
	20	25
	30	
55	Arg Tyr Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu	
	35	40
	45	
60	Trp Val Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ser Tyr Glu Asp	
	50	55
	60	
65	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Arg Asn Thr	
	65	70
	75	80

ES 2 322 116 B1

```

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                        85                        90                        95
5
Tyr Cys Asn Val Asn Val Gly Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
                        100                        105                        110
10
Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Ala Ala Ser Thr His His
                        115                        120                        125
15
His His His His Ala Ser Thr Pro Gly Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro
                        130                        135                        140
20
Asp Pro Leu Glu Pro Ala
145                        150
<210> 9
<211> 883
25 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
30 <223> EspF-bla
<220>
<221> CDS
35 <222> (6)..(866)
<400> 9
40 tccat atg ctt aat gga att agt aac gct gct tct aca cta ggg cgg cag 50
    Met Leu Asn Gly Ile Ser Asn Ala Ala Ser Thr Leu Gly Arg Gln
      1                        5                        10                        15
45 ctt gta ggt atc gca gag aat tcg cac cca gaa acg ctg gtg aaa gta 98
    Leu Val Gly Ile Ala Glu Asn Ser His Pro Glu Thr Leu Val Lys Val
                        20                        25                        30
50 aaa gat gct gaa gat cag ttg ggt gca cga gtg ggt tac atc gaa ctg 146
    Lys Asp Ala Glu Asp Gln Leu Gly Ala Arg Val Gly Tyr Ile Glu Leu
                        35                        40                        45
55 gat ctc aac agc ggt aag atc ctt gag agt ttt cgc ccc gaa gaa cgt 194
    Asp Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu Glu Ser Phe Arg Pro Glu Glu Arg
                        50                        55                        60
60 ttt cca atg atg agc act ttt aaa gtt ctg cta tgt ggc gcg gta tta 242
    Phe Pro Met Met Ser Thr Phe Lys Val Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu
      65                        70                        75
65 tcc cgt att gac gcc ggg caa gag caa ctc ggt cgc cgc ata cac tat 290
    Ser Arg Ile Asp Ala Gly Gln Glu Gln Leu Gly Arg Arg Ile His Tyr
      80                        85                        90                        95

```

ES 2 322 116 B1

5	<p>tct cag aat gac ttg gtt gag tac tca cca gtc aca gaa aag cat ctt 338 Ser Gln Asn Asp Leu Val Glu Tyr Ser Pro Val Thr Glu Lys His Leu 100 105 110</p>
10	<p>acg gat ggc atg aca gta aga gaa tta tgc agt gct gcc ata acc atg 386 Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Cys Ser Ala Ala Ile Thr Met 115 120 125</p>
15	<p>agt gat aac act gcg gcc aac tta ctt ctg aca acg atc gga gga cgg 434 Ser Asp Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu Leu Thr Thr Ile Gly Gly Pro 130 135 140</p>
20	<p>aag gag cta acc gct ttt ttg cac aac atg ggg gat cat gta act cgc 482 Lys Glu Leu Thr Ala Phe Leu His Asn Met Gly Asp His Val Thr Arg 145 150 155</p>
25	<p>ctt gat cgt tgg gaa ccg gag ctg aat gaa gcc ata cca aac gac gag 530 Leu Asp Arg Trp Glu Pro Glu Leu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Asp Glu 160 165 170 175</p>
30	<p>cgt gac acc acg atg cct gta gca atg gca aca acg ttg cgc aaa cta 578 Arg Asp Thr Thr Met Pro Val Ala Met Ala Thr Thr Leu Arg Lys Leu 180 185 190</p>
35	<p>tta act ggc gaa cta ctt act cta gct tcc cgg caa caa tta ata gac 626 Leu Thr Gly Glu Leu Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln Leu Ile Asp 195 200 205</p>
40	<p>tgg atg gag gcg gat aaa gtt gca gga cca ctt ctg cgc tcg gcc ctt 674 Trp Met Glu Ala Asp Lys Val Ala Gly Pro Leu Leu Arg Ser Ala Leu 210 215 220</p>
45	<p>ccg gct ggc tgg ttt att gct gat aaa tct gga gcc ggt gag cgt ggg 722 Pro Ala Gly Trp Phe Ile Ala Asp Lys Ser Gly Ala Gly Glu Arg Gly 225 230 235</p>
50	<p>tct cgc ggt atc att gca gca ctg ggg cca gat ggt aag ccc tcc cgt 770 Ser Arg Gly Ile Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys Pro Ser Arg 240 245 250 255</p>
55	<p>atc gta gtt atc tac acg acg ggg agt cag gca act atg gat gaa cga 818 Ile Val Val Ile Tyr Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met Asp Glu Arg 260 265 270</p>
60	<p>aat aga cag atc gct gag ata ggt gcc tca ctg att aag cat tgg taa 866 Asn Arg Gln Ile Ala Glu Ile Gly Ala Ser Leu Ile Lys His Trp 275 280 285</p>
65	<p>ctgtcagacc aagttta 883</p>
60	<p><210> 10 <211> 286 <212> PRT <213> Artificial</p>
65	<p><220> <223> Synthetic Construct</p>

ES 2 322 116 B1

<400> 10

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

<210> 11

<211> 1354

<212> DNA

65 <213> Artificial

<220>

ES 2 322 116 B1

<223> EspF-Vamy-bla

<220>

5 <221> CDS

<222> (8)..(1354)

<400> 11

```

10      ataacat atg ctt aat gga att agt aac gct gct tct aca cta ggg cgg      49
          Met Leu Asn Gly Ile Ser Asn Ala Ala Ser Thr Leu Gly Arg
          1                               5                               10

15      cag ctt gta ggt atc gca gcg gcc cag ccg gcc atg gct cag gtg cag      97
          Gln Leu Val Gly Ile Ala Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln
          15                               20                               25                               30

20      ctg gtg gag tct tgg gga ggc tcg gtg cag gct ggg ggg tct ctg aga      145
          Leu Val Glu Ser Trp Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
          35                               40                               45

25      ctc tcc tgc aca gcc cct gga ttc acc tcc aat agc tgc cgc atg gac      193
          Leu Ser Cys Thr Ala Pro Gly Phe Thr Ser Asn Ser Cys Arg Met Asp
          50                               55                               60

30      tgg tac cgc cag gct gca ggg aag cag cgc gag tgg gtc tca tct att      241
          Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val Ser Ser Ile
          65                               70                               75

35      agt act gat ggt cgc aca agc tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc      289
          Ser Thr Asp Gly Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
          80                               85                               90

40      acc atc tcc aaa gac aaa gcc aag gac acg gtg tat ctg caa atg aac      337
          Thr Ile Ser Lys Asp Lys Ala Lys Asp Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
          95                               100                              105                              110

45      agc ctg aaa cct gag gac acg gcc atc tat tac tgt gcc gtg agg acg      385
          Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Val Arg Thr
          115                               120                               125

50      aat ggg tat cgt ccg caa tct cac gaa ttt cgc tac tgg ggc ccg ggg      433
          Asn Gly Tyr Arg Pro Gln Ser His Glu Phe Arg Tyr Trp Gly Pro Gly
          130                               135                               140

55      acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc gca tcg ggg gcc gcg tcg acg      481
          Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Ala Ala Ser Thr
          145                               150                               155

60      cac cat cac cat cac cat gct tcg acg ccc ggg ggt gcg ccg gtg ccg      529
          His His His His His His Ala Ser Thr Pro Gly Gly Ala Pro Val Pro
          160                               165                               170

65      tat ccg gat ccg ctg gaa ccg gcc gcg aat tcg cac cca gaa acg ctg      577
          Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Ala Ala Asn Ser His Pro Glu Thr Leu
          175                               180                               185                               190

70      gtg aaa gta aaa gat gct gaa gat cag ttg ggt gca cga gtg ggt tac      625
          Val Lys Val Lys Asp Ala Glu Asp Gln Leu Gly Ala Arg Val Gly Tyr
          195                               200                               205
    
```


ES 2 322 116 B1

	atc gaa ctg gat ctc aac agc ggt aag atc ctt gag agt ttt cgc ccc	673
	Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu Glu Ser Phe Arg Pro	
	210	215
5	gaa gaa cgt ttt cca atg atg agc act ttt aaa gtt ctg cta tgt ggt	721
	Glu Glu Arg Phe Pro Met Met Ser Thr Phe Lys Val Leu Leu Cys Gly	
	225	230
10	gcg gta tta tcc cgt gtt gac gcc ggg caa gag caa ctc ggt cgc cgc	769
	Ala Val Leu Ser Arg Val Asp Ala Gly Gln Glu Gln Leu Gly Arg Arg	
	240	245
15	ata cac tat tct cag aat gac ttg gtt gag tac tca cca gtc aca gaa	817
	Ile His Tyr Ser Gln Asn Asp Leu Val Glu Tyr Ser Pro Val Thr Glu	
	255	260
20	aag cat ctt acg gat ggc atg aca gta aga gaa tta tgc agt gct gcc	865
	Lys His Leu Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Cys Ser Ala Ala	
	275	280
25	ata acc atg agt gat aac act gct gcc aac tta ctt ctg aca acg atc	913
	Ile Thr Met Ser Asp Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu Leu Thr Thr Ile	
	290	295
30	gga gga ccg aag gag cta acc gct ttt ttg cac aac atg ggg gat cat	961
	Gly Gly Pro Lys Glu Leu Thr Ala Phe Leu His Asn Met Gly Asp His	
	305	310
35	gta act cgc ctt gat cgt tgg gaa ccg gag ctg aat gaa gcc ata cca	1009
	Val Thr Arg Leu Asp Arg Trp Glu Pro Glu Leu Asn Glu Ala Ile Pro	
	320	325
40	aac gac gag cgt gac acc acg atg cct gca gca atg gca aca acg ttg	1057
	Asn Asp Glu Arg Asp Thr Thr Met Pro Ala Ala Met Ala Thr Thr Leu	
	335	340
45	cgc aaa cta tta act ggc gaa cta ctt act cta gct tcc cgg caa caa	1105
	Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu Leu Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln	
	355	360
50	tta ata gac tgg atg gag gcg gat aaa gtt gca gga cca ctt ctg cgc	1153
	Leu Ile Asp Trp Met Glu Ala Asp Lys Val Ala Gly Pro Leu Leu Arg	
	370	375
55	tcg gcc ctt ccg gct ggc tgg ttt att gct gat aaa tct gga gcc ggt	1201
	Ser Ala Leu Pro Ala Gly Trp Phe Ile Ala Asp Lys Ser Gly Ala Gly	
	385	390
60	gag cgt ggg tct cgc ggt atc att gca gca ctg ggg cca gat ggt aag	1249
	Glu Arg Gly Ser Arg Gly Ile Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys	
	400	405
65	ccc tcc cgt atc gta gtt atc tac acg acg ggg agt cag gca act atg	1297
	Pro Ser Arg Ile Val Val Ile Tyr Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met	
	415	420
70	gat gaa cga aat aga cag atc gct gag ata ggt gcc tca ctg att aag	1345
	Asp Glu Arg Asn Arg Gln Ile Ala Glu Ile Gly Ala Ser Leu Ile Lys	
	435	440
75	cat tgg taa	1354
	His Trp	

ES 2 322 116 B1

<210> 12
 <211> 448
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Synthetic Construct
 10
 <400> 12

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

ES 2 322 116 B1

	Leu	Ser	Arg	Val	Asp	Ala	Gly	Gln	Glu	Gln	Leu	Gly	Arg	Arg	Ile	His
					245					250					255	
5	Tyr	Ser	Gln	Asn	Asp	Leu	Val	Glu	Tyr	Ser	Pro	Val	Thr	Glu	Lys	His
				260					265					270		
	Leu	Thr	Asp	Gly	Met	Thr	Val	Arg	Glu	Leu	Cys	Ser	Ala	Ala	Ile	Thr
10			275					280					285			
	Met	Ser	Asp	Asn	Thr	Ala	Ala	Asn	Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Gly
		290					295					300				
15	Pro	Lys	Glu	Leu	Thr	Ala	Phe	Leu	His	Asn	Met	Gly	Asp	His	Val	Thr
	305					310					315					320
	Arg	Leu	Asp	Arg	Trp	Glu	Pro	Glu	Leu	Asn	Glu	Ala	Ile	Pro	Asn	Asp
20					325					330					335	
	Glu	Arg	Asp	Thr	Thr	Met	Pro	Ala	Ala	Met	Ala	Thr	Thr	Leu	Arg	Lys
25				340					345					350		
	Leu	Leu	Thr	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Arg	Gln	Gln	Leu	Ile
30			355					360					365			
	Asp	Trp	Met	Glu	Ala	Asp	Lys	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala
35		370					375					380				
	Leu	Pro	Ala	Gly	Trp	Phe	Ile	Ala	Asp	Lys	Ser	Gly	Ala	Gly	Glu	Arg
40		385				390					395					400
	Gly	Ser	Arg	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Leu	Gly	Pro	Asp	Gly	Lys	Pro	Ser
					405					410					415	
45	Arg	Ile	Val	Val	Ile	Tyr	Thr	Thr	Gly	Ser	Gln	Ala	Thr	Met	Asp	Glu
				420					425					430		
50	Arg	Asn	Arg	Gln	Ile	Ala	Glu	Ile	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Lys	His	Trp
			435					440					445			
55																
60																
65																



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 322 116

② Nº de solicitud: 200700644

③ Fecha de presentación de la solicitud: 12.03.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FRAILE, S., MUÑOZ, A., DE LORENZO, V., FERNÁNDEZ, L. A. Secretion of proteins with dimerization capacity by the haemolysin type I transport system of Escherichia coli. Molecular Microbiology. 2004, Vol. 53, Nº 4, páginas 1109-1121. ISSN 0950-382X.	1-17
A	RÜSSMANN, H., GERDEMANN, U., IGWE, E. I. et al. Attenuated Yersinia pseudotuberculosis carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. Infection and Immunity. Junio 2003, Vol. 71, Nº 6, páginas 3463-3472. ISSN 0019-9567.	1-17
A	CHEN, L.-M., BRIONES, G., DONIS, R. O., GALÁN, J. E. Optimization of the delivery of heterologous proteins by the Salmonella enterica Serovar Typhimurium type III secretion system for vaccine development. Infection and Immunity. Octubre 2006, Vol. 74, Nº 10, páginas 5826-5833. ISSN 0019-9567.	1-3,6-13, 15-17
A	CHARPENTIER, X., OSWALD, E. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. Journal of Bacteriology. Agosto 2004, Vol. 186, Nº 16, páginas 5486-5495. ISSN 0021-9193.	1-3,6-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.06.2009

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)