



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 298 055**

⑫ Número de solicitud: 200602175

⑬ Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **09.08.2006**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2008**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2008

⑱ Solicitante/s: **Fundación Marqués de Valdecilla
Escuela de Enfermería, 5ª Planta - Hospital
Avenida de Valdecilla, s/n
39008 Santander, Cantabria, ES**

⑲ Inventor/es: **Álvarez Domínguez, Carmen y
Carrasco Marín, Eugenio**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Péptidos inmunogénicos frente a los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*, anticuerpos y usos de los mismos.**

㉒ Resumen:

Péptidos inmunogénicos frente a los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*, anticuerpos y usos de los mismos. La presente invención se refiere al campo de la biotecnología y más particularmente, a péptidos capaces de inmunizar frente a infecciones producidas por bacterias pertenecientes a los géneros *Listeria* y *Mycobacterium* así como aquellos anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a dichos péptidos.

ES 2 298 055 A1

DESCRIPCIÓN

Péptidos inmunogénicos frente a los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*, anticuerpos y usos de los mismos.

5 La presente invención se refiere al campo de la biotecnología y más particularmente, a péptidos capaces de inmunizar frente a infecciones producidas por bacterias pertenecientes a los géneros *Listeria* y *Mycobacterium* así como aquellos anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a dichos péptidos.

Antecedentes de la invención

10 En la actualidad existen especies bacterianas que, por diferentes motivos, están cobrando cada vez una mayor relevancia dentro del ámbito médico y farmacéutico, y entre las cuales se encuentran aquéllas pertenecientes a los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*.

15 Tanto el género *Listeria* como el género *Mycobacterium*, así como otros grupos de bacterias que presentan especies patógenas, tienen en común que, como resultado de la evolución, muchas de las proteínas o enzimas, que en principio estaban destinadas a la realización de actividades metabólicas, han evolucionado para ser capaces de interactuar con las células hospedadoras y, así, favorecer su crecimiento en el interior celular. Una de las enzimas metabólicas cuya actividad ha evolucionado hasta convertirse en un factor de virulencia en determinadas bacterias patógenas, como *Streptococcus pyogenes*, es la GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato) (Int J. Med. Microbiol. 293, 391-401.). Esta enzima implicada en la parte final de la glicólisis, catalizando la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato a glicerol-1,3-difosfato, nunca ha sido implicada en procesos enzimáticos diferentes ni en *Listeria* ni en el género *Mycobacterium*.

25 Aunque los análisis proteómicos de las proteínas bacterianas han descrito que la GAPDH de *Listeria*, más concretamente de *Listeria monocytogenes* (GAPDH-LM), es una proteína asociada a la membrana de la bacteria (Proteomics 2004, 4: 2991-06) y capaz de ser secretada, se desconoce si tiene otra función enzimática diferente a su implicación en la glicólisis o como proteína de unión al plasminógeno (Proteomics 2005, 5: 1544-57). Las GAPDH de otras bacterias gram-positivas, patógenas pero no intracelulares sino extracelulares, poseen además de su actividad glicolítica, otras actividades enzimáticas que favorecen su actividad como factores de virulencia. Sin embargo, no se ha descrito ninguna actividad distinta a la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato para las GAPDH de los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*, ambos patógenos intracelulares.

35 Una de las actividades enzimáticas que en ocasiones presentan los factores de virulencia es la ADP-ribosilación. Esta actividad supone una modificación covalente limitada únicamente a unas pocas toxinas bacterianas secretadas por bacterias patógenas no intracelulares, gram-negativas o gram-positivas, tales como la toxina diftérica, la proteína ExoS de *Pseudomonas aeruginosa*, la toxina pertúsica y la toxina colérica (Infect. Immun. 2001, 69: 5329-34; PNAS USA. 2004, 101: 6182-87). En general, la ADP-ribosilación inactiva las proteínas diana celulares tales como proteínas de señalización intracelular ó reguladoras del tráfico intracelular.

40 Los factores de virulencia son comúnmente empleados para desarrollar vacunas dirigidas contra aquellos patógenos que los portan, mediante la inoculación completa de dicho factor o con fragmentos del mismo en individuos. Esta estrategia que *a priori* debería resultar sencilla, una vez se ha detectado un factor de virulencia, no lo resulta tanto debido a que (i) la inoculación de factores de virulencia completos resulta muy tóxica, (ii) su generación por técnicas de ADN recombinante da lugar a una estructura conformacional distinta a la que el factor tiene en su estado natural y, por lo tanto, la respuesta humoral y/o celular no resulta eficiente y (iii) las modificaciones postraduccionales que sufre el factor de virulencia en su estado natural provocan que la inoculación con la proteína recombinante o péptidos de ésta produzca una respuesta inmune incapaz de actuar eficientemente contra el patógeno.

50 Estas circunstancias hacen necesario detectar determinadas regiones de los factores de virulencia capaces de dar lugar a una adecuada respuesta inmune y permita una inmunización eficiente frente al patógeno.

Hasta el momento, no se ha detectado ninguna GAPDH de los géneros *Listeria* y *Mycobacterium* capaz de producir una buena respuesta inmune. Tampoco se conoce si estas proteínas, además de su actividad enzimática realizada en la glicólisis, catalizan reacciones relacionadas con la virulencia del patógeno, si pueden interferir con la función de determinadas proteínas implicadas en los procesos de fusión endosoma-endosoma y regulación del tráfico de estos elementos celulares ó si son capaces en general de dar lugar a una buena respuesta inmune. La confirmación de estas características haría posible que estas proteínas fuesen usadas con dianas terapéuticas o para el desarrollo de vacunas.

Descripción de la invención

65 Para llevar a cabo la presente invención, se analizó la interferencia intracelular del patógeno humano y bacteria gram-positiva: *Listeria monocytogenes* (LM), y se observó que la diana intracelular de este patógeno era el factor regulador del tráfico fagosomal, la GTPasa Rab5a, disminuyendo su activación, esto es, el intercambio entre la forma inactiva ó GDP y la forma activa ó GTP, con lo que se bloqueaba su función. Sorprendentemente, se observó que la proteína bacteriana de unión e inhibición de Rab5a era la GAPDH-LM (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de LM), la cuál mediante su acción enzimática de ADP-ribosilación, disminuía la interacción de Rab5a con su factor

de activación, o intercambiador GDP/GTP, siendo la región de la GAPDH-LM responsable de dicha inhibición la región N-terminal de la proteína, en concreto los primeros 22 aminoácidos (22-mer). A lo largo de la descripción, este extremo amino de 22 aminoácidos de GAPDH-LM también será denominado como SEQ ID N° 1.

A partir de este análisis estructural y funcional, se realizó una búsqueda detallada en bases de datos del dominio correspondiente al péptido N-terminal de 22-mer, y se vio que éste presentaba un 86% de homología con el extremo amino terminal de 22 aminoácidos de la GAPDH de *Mycobacterium tuberculosis*, TB, (GAPDH-TB) (Fig. 1a, extremo amino terminal subrayado); mientras que el dominio C-terminal escasamente presentaba una homología del 59% y una identidad de 27% (Fig. 1a, extremo carboxilo terminal subrayado). Cuando se analizó en más detalle el dominio homólogo de la GAPDH-TB se observó una secuencia aminoacídica casi exacta en los 15-primeros aminoácidos (15-mer), subiendo el porcentaje de homología hasta un 99% y difiriendo sólo en un aminoácido con igual carga (K en LM y R en TB. Ver Figura 1a). Como la unión de péptidos a moléculas MHC-I 6 MHC-II presenta una restricción molecular de noánmeros y dodecámeros, respectivamente; es muy probable que en esos 15-mer pudiera haber tanto epítomos MHC-I como MHC-II que podrían así ser compartidos por ambos patógenos. A lo largo de la descripción, el extremo amino de 15 amino ácidos de GAPDH-LM y GAPDH-TB, podrán ser denominados respectivamente como SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3.

Continuando con este estudio estructural se analizaron los diferentes N-terminales cortos (15-mer) de las GAPDH de diferentes especies dentro del género *Mycobacterium*, tanto patógenos humanos como patógenos de animales importantes en la industria ganadera/alimenticia y diferentes controles de otras bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas, así como la secuencia de las GAPDH humana y murina. Este estudio que se muestra en la Figura 2, destaca que sólo el N-terminal de las GAPDH de *Listeria* y del género *Mycobacterium* presentan la mayor homología posible de un 98% (aminoácidos en negrita en la Fig. 2); mientras que esta homología disminuye al 60% o 40% cuando se estudian los controles negativos correspondientes a la GAPDH humana ó de ratón, respectivamente.

Dentro del género *Mycobacterium*, esto es, *tuberculosis*, *avium*, *leprae* (MI) y *bovis*, si se extiende el estudio estructural a los primeros 30 aminoácidos, se puede apreciar que son 100% homólogos para *M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. Bovis*.

Cuando el estudio se extiende bien a otras gram-positivas cuyas GAPDH se ha descrito que tienen actividad de ADP-ribosilación, tales como *Streptococcus pyogenes* ó *Staphylococcus aureus* (Pancholi, V. And Fishetti, V.A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8154-8158. Molinari, G., Rohde, M., Just, I., Aktorias, K. and Chatwal, G.S. (2006). *Infect. Immun.* 74: 3673-36677), la homología del péptido 15-mer se rebaja a un 75-80%, pero cuando se analiza el de otras gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, que presenta una toxina específica con actividad de ADP-ribosilación denominada ExoS (Bette-Bobillo, P., Giro, D., Sainte-Marie, J. and Vidal, M. (1998). *Biochem. Biophys. Res. Común.* 244: 3366-341), la región N-terminal de la GAPDH, en concreto el péptido de 15-mer, era escasamente 60% homólogo al de la GAPDH-LM (ver Fig. 2).

Esto sugería que la GAPDH de *Pseudomonas* no presentaría capacidad de ADP-ribosilación sobre Rab5a y, por ello, se analizó la comparación funcional de distintos extractos proteicos y su capacidad de ADP-ribosilar Rab5a. Como se muestra en la Figura 3, tanto el extracto de LM, como un extracto celular murino de macrófagos infectados con LM (carrera E1, Fig. 3), como el extracto de TB son capaces de ADP-ribosilar Rab5a, y en menor medida el extracto de MI, cuya capacidad de ADP-ribosilación sobre Rab5a era similar a la del péptido de 22-mer N-terminal de la GAPDH-LM (carrera - para extracto y + para péptido en la Fig. 3). Mientras, los extractos de *Escherichia coli* (carrera Ec, Fig. 3), un extracto celular murino de macrófagos sin infectar pero conteniendo GAPDH murina (carrera E, Fig. 3) o un extracto celular murino de macrófagos infectados con LM muerta por calor (HKLM) previo a la infección (carrera E2 en la Fig. 3) eran incapaces de ADP-ribosilar Rab5a.

Todos estos datos estructurales de alta similitud entre el género *Listeria* y el género *Mycobacterium* indican no sólo que la posible interferencia con Rab5a es común a ambos géneros, sino que sorprendentemente esta similitud se extiende también a su respuesta inmune, tal y como se muestra en los ejemplos que forman parte de la memoria de la presente invención.

Por tanto, los inventores de la presente invención han descubierto que GAPDH-LM y GAPDH-TB son capaces de realizar dos acciones relevantes no conocidas hasta la fecha. La primera acción reside en su capacidad de ADP-ribosilación donde, además, dicha capacidad le sirve para inactivar a la proteína celular reguladora del tráfico fagosomal, Rab5a. Tal y como mostramos en la presente invención, dicha inactivación de Rab5a por la GAPDH, es mediada por la región N-terminal de la proteína, en concreto por el péptido que contiene los primeros 22 aminoácidos.

Por otro lado, la segunda acción interesante de GAPDH-LM y GAPDH-TB se puede inferir de su localización como proteína asociada a la membrana externa de la pared bacteriana de ambos patógenos. Donde el péptido N-terminal quedaría expuesto lo que haría que se extrajese con facilidad ó que pudiera ser accesible al reconocimiento por anticuerpos. Así, y puesto que LM no induce una respuesta humoral, esta proteína podría ser la única capaz de inducir una adecuada respuesta inmune tanto humoral como celular. De hecho, la inmunización con SEQ ID N° 1- agregado pero sin adyuvante, es decir, sólo con el excipiente del adyuvante, el aceite mineral o IFA, es capaz de generar una buena respuesta inmune en conejos generando anticuerpos, lo que es sinónimo de una buena respuesta humoral y celular.

Además, el análisis directo de la capacidad del péptido de SEQ ID N° 1 para inducir una buena respuesta de células T se investigó tras inmunización de ratones en los cojinetes plantares y análisis de la capacidad de respuesta específica a dicho péptido por las células T, aisladas de los ganglios poplíteos de dichos ratones. Este estudio indicó que tan sólo 0.1 µg/ml del péptido eran necesarios para inducir una buena respuesta inmune por dichas células T al menos 10 veces superior frente al control sin péptido.

La versatilidad del péptido en inducir una buena respuesta inmune queda también reflejada por la propia versatilidad del anticuerpo para reconocer varios patógenos, lo que indicaba que podría ser un buen candidato a probar como vacuna.

En definitiva, GAPDH-LM constituye un antígeno interesante tanto en el campo de la patogenia bacteriana al ser el mismo factor de virulencia compartido por dos bacterias intracelulares; pero también es un antígeno peculiar y prometedor en el área de la inmunología, puesto que un mismo antígeno de dos bacterias distintas compartirían regiones aminoácidas suficientemente amplias (15-mer) como para contener epítomos reconocidos por células B, epítomos reconocidos por células T CD4+ (MHC-II) y por células T CD8+ (MHC-I); lo cuál se puede inferir, en un principio, ya que el anticuerpo de conejo generado anti-SEQ ID N° 1, obtenido por inmunización exclusiva con el péptido sin adyuvante, es capaz de reconocer la proteína en una estructura compleja como la bacteria entera, como en extractos proteicos de ambos géneros de bacterias, *Listeria* y *Mycobacterium*, donde dicho péptido está expuesto (ver ejemplos y Figura 6). La misma conclusión se puede extraer del hecho de que la respuesta T generada por el péptido sea muy buena (Tabla 1), que las células T CD41CD8 tengan la capacidad de transferir inmunidad frente a dos patógenos distintos. (Tabla 2) y de su capacidad para ser empleado como vacuna.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido aislado inmunogénico (de aquí en adelante polipéptido de la invención) frente a cualquiera de los géneros *Listeria* y *Mycobacterium* seleccionado del grupo que comprende:

- a) Polipéptido cuya secuencia comprende la SEQ ID N° 1.
- b) Polipéptido cuya secuencia comprende fragmentos de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID N° 1 que mantengan la capacidad inmunogénica frente a los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*
- c) Polipéptido cuya secuencia tiene al menos un 85% de homología con cualquiera de los polipéptidos de a) y b) . En una realización preferida homología es de al menos el 90% y más preferentemente de al menos el 95%.

En una realización preferida el polipéptido de la invención tiene la secuencia SEQ ID N° 1.

En una realización también preferida de este aspecto de la invención el polipéptido de la invención es elegido del grupo:

- a.- Polipéptido cuya secuencia comprende la SEQ ID N° 2.
- b.- Polipéptido cuya secuencia consiste en la SEQ ID N° 2.

En una realización también preferida de la presente invención el polipéptido es elegido del grupo:

- a.- Polipéptido cuya secuencia comprende la SEQ ID N° 3.
- b.- Polipéptido cuya secuencia consiste en la SEQ ID N° 3.

En una realización todavía más preferida el polipéptido de la invención es un polipéptido derivado que ha sufrido modificaciones postraduccionales o realizadas mediante métodos sobradamente conocidos en el estado de la técnica.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido (de aquí en adelante polinucleótido de la invención) aislado capaz de codificar para cualquiera de los polipéptidos de la invención.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento del mismo (en adelante anticuerpo de la invención) capaz de reconocer cualquiera de los polipéptidos o polipéptidos derivados de la invención.

Un cuarto aspecto de la invención hace referencia a un polipéptido de la invención fusionado o unido químicamente a un péptido, polipéptido o proteína adicional.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un vector de expresión o sistema de expresión (en adelante vector o sistema de expresión de la invención) que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora aislada, procariota o eucariota, (en adelante célula hospedadora de la invención), transformada, o transfectada con cualquiera de los polinucleótidos de la invención o con cualquiera de los vectores o sistemas de expresión de la invención.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un método para elaborar el polipéptido de la invención (en adelante método de la invención), mediante técnicas de ADN recombinante o síntesis química.

En una realización preferida, el método de la invención comprende cultivar una célula hospedadora de la invención en condiciones tales que se exprese dicha cualquiera de los polinucleótidos de la invención, y aislar dicho polipéptido expresado.

Un octavo aspecto de la invención se refiere a un polipéptido de la invención para su uso como medicamento.

Un noveno aspecto de la invención se refiere a una vacuna que comprende cualquiera de los polipéptidos de la invención.

Una realización preferida de la presente invención comprende el uso de un polipéptido de la invención para la elaboración de una vacuna capaz de inmunizar frente a una infección producida por bacterias pertenecientes al género *Listeria* y/o *Mycobacterium*, más particularmente *Listeria monocytogenes* y/o *Mycobacterium tuberculosis*.

Una realización aún más preferida de la presente invención comprende el uso de un anticuerpo de la invención, para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección producida por bacterias pertenecientes al género *Listeria* y/o *Mycobacterium*, más particularmente *Listeria monocytogenes* y/o *Mycobacterium tuberculosis*.

Un décimo aspecto de la presente invención se refiere a moléculas moduladoras de la actividad de GAPDH de los géneros *Listeria* y/o *Mycobacterium*, activadores o inhibidores, diseñados específicamente para interactuar con cualquiera de los péptidos de la invención.

Un décimo primer aspecto de la presente invención se refiere a moléculas diseñadas específicamente a partir del dominio de ADP-ribosilación de la GAPDH de los géneros *Listeria* y/o *Mycobacterium* y capaces de mimetizar la actividad de dicho dominio.

Un décimo segundo aspecto de la invención se refiere al uso del dominio de ADP-ribosilación de la GAPDH de los géneros *Listeria* y/o *Mycobacterium* para el diseño racional de drogas.

Un décimo tercer aspecto de la invención se refiere al uso de cualquiera de los polipéptidos, polipéptidos derivados de la invención o fragmentos de los mismos de la invención por su capacidad de ADP-ribosilación.

A continuación se facilita la definición de una serie de términos que ayudan a interpretar correctamente la presente invención.

El término “*polipéptido o péptido*” se usa para designar una secuencia lineal de aminoácidos conectados entre sí por enlaces amida entre el grupo alfa-amino de un aminoácido y un grupo alfa-carboxi del aminoácido adyacente. A partir de dichos polipéptidos pueden derivarse fragmentos de menor tamaño de al menos 8 aminoácidos, preferiblemente de al menos 15 aminoácidos y preferiblemente de al menos 22. Dichos polipéptidos y fragmentos incluyen cualquier modificación postraduccional o realizada mediante métodos sobradamente conocidos en el estado de la técnica. Estos polipéptidos y fragmentos modificados serán denominados como “*polipéptidos o péptidos derivados*”.

El término “*polinucleótido*” se usa para designar una secuencia lineal de nucleótidos o ribonucleótidos. Este término está referido exclusivamente a la estructura primaria de la molécula incluyendo ADN mono y bicatenario, así como ARN mono y bicatenario. Del mismo modo, también se incluyen las formas modificadas de estas moléculas, por ejemplo, por metilación.

El término “*epítipo*” hace referencia a un determinante antigénico de un polipéptido; un epítipo puede comprender 3 aminoácidos en una conformación espacial que es exclusiva del epítipo, generalmente constituido por al menos 5 aminoácidos, y más usualmente constituido por al menos 8-10 aminoácidos. Los métodos para determinar la conformación espacial de aminoácidos son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones.

Un “*polipéptido o péptido inmunogénico*” hace referencia a un polipéptido capaz de generar anticuerpos específicos, así como de promover tanto una respuesta humoral como celular.

El término “*vacuna*” hace referencia a preparados antigénicos o células tratadas previamente con dichos preparados antigénicos y capaces de promover una respuesta humoral y/o celular o vectores de expresión u otras formas de vectores vacuna. Esta respuesta dará lugar a la generación de una memoria inmunológica produciendo, en la mayoría de los casos, inmunidad permanente o transitoria frente a un patógeno determinado.

El término “*anticuerpo*” hace referencia tanto a anticuerpos monoclonales como policlonales capaces de interactuar con los polipéptidos definidos en la presente invención.

El término “*fragmento de anticuerpo*” hace referencia a todos aquellos fragmentos de anticuerpos capaces de interaccionar frente a los péptidos de la invención y fragmentos de los mismos, donde dichos fragmentos comprenden las regiones variables Vh y/o VI, así como sus regiones conservadas.

El término “*dominio*” de una proteína hace referencia a la estructura tridimensional que adquiere una determinada región o polipéptidos de dicha proteína y que puede llevar a cabo funciones meramente estructurales o enzimáticas. Más concretamente, este término hará referencia a la estructura tridimensional adoptada por los polipéptidos, polipéptidos derivados o fragmentos de los mismos de la invención, correspondientes al extremo de 22 aminoácidos de la región amino terminal de la GAPDH de los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un especialista habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento. A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones, la palabra “comprende” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. En la figura 1a se muestra la secuencia amioacídica de las GAPDH-TB y GAPDH-LM. Parte superior: extremo amino terminal de 22 amino ácidos de GAPDH-TB (subrayado) homólogo al 99% en sus 15 primeros aminoácidos con el extremo amino terminal de 15 amino ácidos de GAPDH-LM. Parte inferior: se pueden observar los extremos amino y carboxilo (subrayado) de GAPDH-LM. En la figura 1b se muestra la estructura 3D de la GAPDH-LM. El dominio de unión a sustrato se refiere al dominio con actividad ADP-ribosilante y el dominio de unión NAD se corresponde con el dominio que cataliza la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato a glicerol-1,3-difosfato en la glicólisis.

Figura 2.- Comparación estructural entre los N-terminales, 15-mer, de diferentes GAPDH. En negrita se destaca el péptido 15-mer del extremo N-terminal de aquellas bacterias en las que presenta más de un 90% de homología; subrayado, aquellas bacterias del género *Mycobacterium* cuyo N-terminal extendido (30-mer) es 100% homólogo y en minúscula, el único aminoácido diferente entre *Listeria* y *Mycobacterium*.

Figura 3.- Capacidad de ADP-ribosilación sobre Rab5a de los diferentes extractos bacterianos y celulares. ADP-ribosilación de la proteína de fusión GST-Rab5a: wt en presencia de 30 µg de los diferentes extractos: TB, extracto de *Mycobacterium tuberculosis*; MI, extracto de *Mycobacterium leprae*; Ec, extracto de *Escherichia coli*; LM, extracto de *Listeria monocytogenes*, E1; extracto de células tipo macrófago de ratón infectadas con LM; E2, extracto de células tipo macrófago de ratón infectadas con LM muertas por calor; E, extracto de células tipo macrófago de ratón sin infectar.

Figura 4.- A. Proteínas reconocidas por el anticuerpo anti-SEQ ID N° 1. PNS (LM), fracción post-nuclear de células infectadas con LM; Fagos, fagosomas purificados de la fracción PNS (LM); PNS (NI), fracción post-nuclear de células no infectadas con LM; LM-lisado, lisado de LM conteniendo proteínas de la pared; LM-sobrenadante, sobrenadante de LM conteniendo proteínas secretadas; Nt-E, extracto crudo de LM; R5t-eluido o R5t-E, eluido de columna-Rab5a de afinidad incubada con extracto crudo de LM. B-E. Células E-clone infectadas con LM vivas durante 15 min (B) o 60 min (C-D) e incubadas con anticuerpos anti-SEQ ID N° 1 (B, C y E) o con suero preimmune (D) procedente del mismo animal a partir del cual se obtienen los anticuerpos frente a SEQ ID N° 1.

Figura 5.- Proteínas reconocidas en distintos mutantes de LM por el anticuerpo anti-SEQ N° 1 del N-terminal de la GAPDH-LM. Distintos lisados de diferentes mutantes de Lm: (i) mutante carente de listeriolisina O - LM-/lisado y LM-/sup - (carreras 3 y 4); (ii) mutante carente de fosfolipasa C - plcA/B-lisado ó sobrenadantes de éstas plcA/B- sup - (carreras 5 y 6); (ii) fenotipo salvaje - LM+/lisado y LM+/sup (carreras 1 y 2).

Figura 6.- Proteínas reconocidas por el anticuerpo anti-22mer de la GAPDH-LM o anti-SEQ ID N° 1 procedentes de 30 µg de distintos extractos bacterianos y celulares: Lm, *Listeria monocytogenes*; TB, *M. tuberculosis*; MI, *M. leprae* y cel, extracto celular.

Figura 7: *Panel A.* Fagosomas desnudos (30 µg por carrera) incubados con 3 µg de GST-Rab5a:wt prenilada y pretratada con diferentes concentraciones de SEQ ID N° 1 (N1 y N2) y SEQ ID N° 4 (C1 y C2) (N1 y N2 se corresponden respectivamente con 100 y 10 ng/ml de la SEQ ID N° 1. C1 y C2 se corresponden respectivamente con 100 y 10 ng/ml de la SEQ ID N° 4) y la presencia (carreras +) o ausencia (carreras -) de 5 µg de extractos de LM (Nt-E). *Panel B.* 5 µg de la proteína recombinante GST-Rab5a: wt fue ADP-ribosilada empleando 50 µM de NAD-biotinilado como sustrato en presencia o ausencia de Nt-E y en presencia de N1, N2 y C1. *Panel C.* Fagosomas desnudos incubados con GST-Rab5a:wt prenilada y ADP-ribosilada (carreras ADP-r +), como sucedía en el panel B, empleando NAD en lugar de NAD-biotinilado y NI como fuente de proteínas de ADP-ribosilación en presencia o ausencia de extractos de LM (carreras Nt-E + y Nt-E -). *Panel D.* Fagosomas desnudos incubados con GST-Rab5a:wt prenilada y ADP-ribosilada (carreras ADP-r +) o no (carreras ADP-r -) en presencia His-EEA1 o His-Vps9.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

5 Estudio inmune de las GAPDH de los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*

Para la obtención de anticuerpos se utilizó una concentración del péptido de SEQ ID N° 1 (22-mer de la GAPDH-LM) de 10 mM que se oxida tras su resuspensión en agua y desecación por vacío como material insoluble. Este tratamiento producía agregados moleculares del péptido que resultaron ser altamente inmunogénicos al no necesitarse de su emulsión en adyuvante completo de Freund (CFA) para obtenerse una buena respuesta inmune, sino que sólo con adyuvante incompleto que contiene el excipiente, ó aceite mineral (IFA) fue suficiente para generar una respuesta inmune. El agregado insoluble se inyectó en conejos en la orejas ó en el peritoneo de ratones. Tras 14 días se inoculó una primera dosis de recuerdo con 10 mM del péptido perfectamente disuelto en tampón salino, y 7 días después con otra dosis de recuerdo igual a la anterior. Finalmente, se sangró al animal *ad libitum*, recogiendo el suero con anticuerpos anti- SEQ ID N° 1 que se probó sobre el péptido pegado a placas de ELISA.

Con dichos anticuerpos se analizaron los distintos extractos bacterianos de LM: (i) lisados bacterianos de LM conteniendo las proteínas de la pared, por lo tanto, proteínas estructurales; (ii) sobrenadantes del crecimiento de LM que contienen las proteínas secretadas por LM (Figuras 4 y 5); (iii) extractos crudos de LM, que contiene la mayor parte de las proteínas tanto de la pared como del citosol bacteriano (carreras Nt-E en Fig. 4 y LM en Fig. 6); (iv) así como un eluido de una columna de afinidad con Rab5a, que contenía todas las proteínas de LM que se unen a Rab5a (carrera R5t- eluido en Fig. 4).

Por otro lado, con dichos anticuerpos se analizaron distintas fracciones celulares murinas de macrófagos infectados o no con el patógeno, distintas fracciones bacterianas de LM, tanto estructurales como lisados de bacterias, ó extractos totales bacterianos ó secretadas al medio como sobrenadantes de su crecimiento, así como extractos del género *Mycobacterium* y extractos de células murinas (Figuras 4-6).

Todo este análisis ha reflejado los siguientes resultados realizados con el anticuerpo anti-SEQ ID N° 1 del N-terminal de la GAPDH-LM:

1. El anticuerpo reconoce tanto a la GAPDH-LM de la pared estructural, como la proteína secretada al medio de LM patogénica (carreras LM-lisado y LM-sobrenadante en Fig. 4 y carreras LM+/lisado y LM+/sup en Fig. 5), como de distintas mutantes de LM en los factores de virulencia fagosomales: la listeriolisina O, LLO, (carreras LM-/lisado y LM-/sup en Fig. 5) ó las fosfolipasas C (carreras plcA/B-/lisado y plcA/B-/sup en Fig. 5) como de un extracto crudo total de LM (carreras Nt-E en Fig. 4 y LM en Fig. 6), así como del eluido de las columnas de afinidad con Rab5a incubadas con dicho extracto crudo de LM (carrera R5t- eluido o R5t-E en Fig. 4).
2. El anticuerpo reconoce también la GAPDH-LM de células infectadas con LM (carrera PNS LM en Fig. 4), así como fagosomas conteniendo la bacteria viva (carrera Fago LM en Fig. 4).
3. El anticuerpo también reconoce la GAPDH del género *Mycobacterium*, tanto *tuberculosis* como *leprae* de extractos crudos de dichos patógenos con los que comparte más de un 86% de homología estructural (carreras TB y MI en Fig. 6).
4. El anticuerpo no reconoce sin embargo la GAPDH murina presente en los post-nucleares de las células macrofágicas no infectadas con LM (carrera PNS (NI) en Fig. 4), ni en un extracto celular total de éstas (carrera cel en Fig. 6), con la que escasamente comparte un 40% de homología estructural.
5. Además, el anticuerpo es capaz de reconocer toda la estructura bacteriana de LM, una vez ha infectado a células E-clone (Alvarez-Domínguez, C., Barbieri, A.M., Beron, W., Wandinger-Ness, A. and Stahl, P.D. (1996). *J. Biol. Chem.* 271: 13834-13843) durante un periodo de entre 15 y 60 minutos (Figura 4b y 4c). Sin embargo, el suero preinmune, esto es, antes de la infección del animal con SEQ ID N° 1, se puede apreciar que no es específico para LM (Figura 4d).
6. El anticuerpo no reconoce ninguna banda en fracciones PNS de células no infectadas con LM (carrera PNS (NI), Figura 4) o de E clone infectada con HKLM (Heat killed LM) (carrera PNS (HKLM), Figura 4), esto es, LM matada con calor mediante su incubación durante 60 minutos a 70°C.

Así y puesto que los estudios estructurales e inmunes son equivalentes, se puede inferir que los anticuerpos generados frente a SEQ ID N° 1 son anticuerpos estructurales que reconocen secuencias similares con más de un 85% de homología de secuencia en bacterias altamente relacionadas y, por lo tanto, y más concretamente de *Mycobacterium tuberculosis* (SEQ ID N° 3). Esto sugiere que un mismo antígeno, la GAPDH-LM, contendría tanto epítomos de células B, como de células T.

Ejemplo 2

Análisis de la respuesta T generada por la SEQ ID N° 1

- 5 Se inmunizaron ratones con la SEQ ID N° 1 en los cojinetes plantares y tras 7 días de inmunización se aislaron los ganglios poplíteos, donde fundamentalmente se recogen células T y dendríticas específicas para dicho antígeno. Con las células aisladas de dichos ganglios se analizó su capacidad de generar una respuesta T frente a SEQ ID N° 1 con una cinética de dosis-respuesta (Tabla 1).

TABLA 1

10 *Capacidad de respuesta T generada por el péptido de 22-mer N-terminal de la GAPDH-LM. Tras homogenización de los ganglios poplíteos, se cultivan las células en presencia de diferentes concentraciones del péptido durante 24*
 15 *horas, tras las cuales las últimas 8 horas se añade ³H-timidina (timidina tritiada) que se incorporará al DNA de las células en proliferación*

Concentración del péptido (µg/ml) (SEQ ID N° 1 N-terminal GAPDH-LM)	Proliferación celular (cpm de ³ H-timidina)
500	393 ± 21
50	65.580 ± 500
5	24.809 ± 870
0.5	20.000 ± 1.760
0.05	14.860 ± 860
0	2.760 ± 458

20 Dada la buena respuesta celular generada por el péptido de la SEQ ID N° 1 de la GAPDH-LM, se analizó si era capaz de conferir protección frente a una infección por *Listeria monocytogenes*. Para ello se diseñó un protocolo de
 25 vacunación con células dendríticas que habían sido pretratadas con el péptido *in vitro* (dosis de 10 µg/ml). De esta forma, las células dendríticas procesarán el péptido, y el epítipo adecuado se unirá tanto a moléculas MHC-I como MHC-II, según proceda, que tras lavar el exceso de péptido serán utilizadas como vector vacuna específico para dicho
 30 péptido e inoculadas en ratones de la misma cepa congénica (en nuestro caso, CBA/J).

35 Inyectando intraperitonealmente 2×10^6 células dendríticas-péptido específicas por ratón, tras 7 días se inocula otra dosis de recuerdo similar con el mismo número de células dendríticas-péptido específicas. Como control, en otro grupo de animales se inocula el mismo número de células dendríticas pero no tratadas con dicho péptido, luego no específicas para éste. Tras 14 días en total, se inoculan dichos ratones con una dosis sub-letal de *Listeria monocytogenes* (para el
 40 caso de CBA/J se inoculan 5×10^4 bacterias/ratón). Tras 3 días post-infección, se sangran los ratones para la obtención de suero y se sacrifican para su análisis clínico y recuperación de bazo e hígados donde se realizará un conteo de viables, CFU, que determinará el número de LM recuperadas en cada caso e indicará la eficiencia de dicho protocolo de
 45 vacunación para conferir protección frente al patógeno. Los datos obtenidos de este estudio se recogen en la Tabla 2.

TABLA 2

50 *Protección de las células dendríticas-péptido específicas frente a una infección con dosis sub-letal de LM. Tras el protocolo de vacunación, se extrae sangre, así como órganos inmunes LM-específicos: bazo e hígado, para realizar el recuento de CFU y analizar la condición física general de los animales inmunizados*

Condición de vacunación	CFU en bazo	CFU en hígado	Datos clínicos
Dendríticas + péptido	$6,8 \times 10^3 \pm 231$	$1,6 \times 10^3 \pm 203$	Bazo normal, hígado normal, intestinos normales.
Dendríticas (control)	$4,1 \times 10^4 \pm 1234$	$2,9 \times 10^5 \pm 2700$	Esplenomegalia, hígados hemolizados, inflamación intestinal

Como se observa en este protocolo de vacunación, las células dendríticas específicas para el péptido, fueron capaces de conferir una protección muy buena, mayor del 80% en el hígado y de un 50% en el bazo, frente a una dosis subletal del patógeno.

5 Ejemplo 3

Efecto inhibitorio de GAPDH-LM sobre Rab5a

En primer lugar, se analizó el reclutamiento de Rab5a de fagosomas incluyendo diferentes concentraciones de los péptidos diseñados a partir de los extremos amino y carboxilo de GAPDH-LM (Figura 1a). Tal y como se muestra en la figura 7A, la preincubación de la proteína de fusión GST-Rab5a con 100 ng/ml de SEQ ID N° 1 (N1) y SEQ ID N° 4 (C1) y 10 ng/ml SEQ ID N° 1 (N2) y SEQ ID N° 4 (C2) reveló que N1 o N2 era capaz de competir con el extracto Nt-E (extracto crudo de LM) disminuyendo aproximadamente 10 veces el efecto de unión de Rab5a sobre fagosomas desnudos de HKLM. Esto indica que el extremo amino terminal de GAPDH-LM contiene el dominio de unión a Rab5a mientras que el extremo carboxilo terminal no participaba en esta interacción.

Al entender que la ADP-ribosilación podía estar implicada en el proceso de inhibición de Rab5a, se investigó si el extracto Nt-E mostraba actividad ADP-ribosilante en la presencia o la ausencia de diferentes concentraciones de los péptidos de los extremos amino y carboxilo de GAPDH-LM (Fig. 1a), siguiendo el protocolo desarrollado por Zhang (Zhang J. (1997). *Methods Enzymol.* 280: 255-65) que emplea NAD-biotina como sustrato y la proteína recombinante de fusión GST-Rab5a: wt.

Así, la proteína recombinante (GST-Rab5a: wt) donde se quiere probar dicha acción, se incubó con N1 en el siguiente tampón: 25 mM Tris-ClH, pH 7.6, 15 mM ATP, 100 mM MgCl₂, 10 mM NAD, 2.5 mM ADP-ribosa y 50 pM de NAD-biotina, en presencia ó ausencia de 5 pg de proteínas citosólicas (extracto de citosol celular proveniente de macrófagos activados con interferón-gamma como fuente de co-factores enzimáticos), durante 30 minutos a 37°C y se recuperó la proteína problema mediante la parte fusogénica unida a columnas de afinidad y/o diluyéndola 10X en hielo con PBS para parar la reacción. La reacción de ADP-ribosilación se observa bien por su aumento aparente de peso molecular al correr una muestra de la proteína problema ADP-ribosilada y compararla con la proteína problema no tratada en geles 10% SDS-PAGE, o bien tras transferencia de dichas proteínas separadas en los geles de SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa donde los western-blots se revelarán con estreptoavidina conjugada a peroxidasa, que se une al NAD-biotinilado incorporado a la proteína ADP-ribosilada como producto de la reacción enzimática.

Tal y como se muestra en la figura 7B, la GST-Rab5a: wt era ADP-ribosilada en presencia de una fuente enzimática: Nt-E, N1 o un lisado celular obtenido a partir de células E-clone infectadas con LM vivas (E1 y E2). Mientras, la ADP-ribosilación no fue observada en ausencia de una fuente enzimática, altas concentraciones de SEQ ID N° 4 (C1) y un lisado de células E-clone infectadas con HKLM y no infectadas. La sola adición de N1 mostró una baja pero significativa señal de ADP-ribosilación. La señal de ADP-ribosilación más elevada fue detectada en los extractos Nt-E tras la adición de cualquiera de las concentraciones de SEQ ID N° 1 (N1 y N2).

Una vez comprobada la capacidad de ADP-ribosilación de SEQ ID N° 1 se pasó a comprobar si la Rab5a ribosilada era capaz de unirse a fagosomas desnudos de HKLM.

Tal y como se muestra en la figura 7C, Rab5a ribosilada (Rab5a-ADP) empleando N1 es capaz de unirse más eficientemente a los fagosomas desnudos de HKLM que la Rab5a sin ribosilar. Esto sugiere que la ADP-ribosilación es responsable de la retención de Rab5a en los fagosomas.

Para comprobar como la ADP-ribosilación era capaz también de afectar a la activación de Rab5a, se examinó el efecto de esta modificación sobre las interacciones con dos diferentes efectores involucrados en la activación de Rab5a: el factor Vps9 y la proteína de unión a GTP (EEA1).

Empleando las proteínas recombinantes His-Vps9 e His-EEA1, se planteó un ensayo de unión en presencia de la proteína recombinante GST-Rab5a: wt ribosilada y sin ribosilar. Seguidamente se realizó un ensayo de reclutamiento de fagosomas desnudos de HKLM seguido de una inmunoprecipitación de las proteínas His-Vps9 e His-EEA1. El resultado de este ensayo se muestra en la figura 7D, donde se puede observar que la ADP-ribosilación no afecta a la unión His-EEA1/Rab5a, aunque reduce significativamente la interacción con His-Vps9/Rab5a. Implicando esto una menor interacción con efectores de la fusión endosoma-endosoma y, consecuentemente, una posible disminución en esta actividad.

De estos ensayos se deduce que el péptido SEQ ID N° 1 de la GAPDH-LM es responsable: (i) reclutamiento de Rab5a a los fagosomas mientras que la SEQ ID N° 4 no está implicado, (ii) de su ADP-ribosilación en presencia o no del extracto de *Listeria*, (iii) su retención en éstas fracciones fagosómicas, (iv) del bloqueo en la unión a su activador His-Vps9 que intercambia la forma GDP, inactiva, por la forma GTP, activa, y en consecuencia de responsable su de su inactivación.

Al ser la activación de Rab5a necesaria para la fusión endosoma-endosoma, se realizó un ensayo en el que se pudiese comprobar como afectaba a la fusión de fagosomas desnudos de HKLM la presencia de GST-Rab5a: wt pretratada o no con Nt-E, R5t-E, N1 y C1 (ver ejemplo 4). Tal y como se muestra en la tabla 3 GST-Rab5a: wt pretratada

con Nt-E o N1 bloquea la reacción de fusión, mientras que el pretratamiento R5t-E o C2 no afectan en absoluto a este proceso. De esta forma, se demuestra que la ADP-ribosilación llevada a cabo por el extremo amino de GAPDH-LM afecta a la activación de Rab5a inactivando la fusión endosoma-endosoma y favoreciendo la supervivencia de LM en el interior celular.

TABLA 3

Fusión de fagosomas conteniendo HKLM y endosomas no conteniendo ninguna Rab y dependiente de Rab5a

Condición: referencia (0.5 mg/ml citosol)	Pretratadas con Rab5a	Unidades de fusión relativas
SIN citosol	NO	0.001 ± 0.0005
control	NO	1.00 ± 0.002
Extracto de LM (10 µg/ml)	SI	0.20 ± 0.005
Extracto de LM (10 µg/ml)	NO	0.65 ± 0.020
Extracto de LM sin proteínas de unión a Rab5 (10 µg/ml)	SI	0.98 ± 0.010
Extracto de LM sin proteínas de unión a Rab5 (10 µg/ml)	NO	0.97 ± 0.015
N2 añadido (10 µg/ml)	SI	0.25 ± 0.003
N2 añadido (10 µg/ml)	NO	0.68 ± 0.002
C2 añadido (10 µg/ml)	SI	1.00 ± 0.003
C2 añadido (10 µg/ml)	NO	0.98 ± 0.015

Los complejos ss-NHS-biotina/fagosomas y endosomas de HKLM con estreptoavidina-HRP fueron tratados con GDI (del inglés, guanidin-dissociation-inhibitor) para retirar los diferentes tipos de proteínas Rab, en su forma molecular GDP, que se encontraban en las membranas de los fagosomas y endosomas y así obtener éstos desnudos. Seguidamente, estas fracciones sub-celulares fueron resuspendidas en tampón de fusión suplementado con proteínas citosólicas (0.5 mg/ml) y con 5 µg de GST-Rab5a: wt prenilada y pretratada o no con diferentes reactivos.

La reacción de fusión fue realizada a 37°C durante 45 min y siendo detenida mediante su inmersión en tampón de homogeneización (HBE) y hielo y lavada dos veces antes de la tisis de las fracciones sub-celulares con un tampón de tisis de baja composición en detergente. Las bacterias intactas que con este tampón de baja concentración de detergente no se lisan al ser bacterias gram-positivas, se recuperaron por centrifugación.

Una de las funciones fundamentales de Rab5a es ser el regulador de las interacciones, esto es, fusiones entre fagosomas y endosomas. Una modificación covalente como la ADP-ribosilación podría afectar a esta función. Para establecer un sistema de fusión entre fagosomas y endosomas que sólo dependa de Rab5a, se eliminan de éstos todas las posibles Rabs, mediante tratamiento con GDI y posterior incubación con Rab5a pre-tratada o no con distintos reactivos que pudieran o no ADP-ribosilarla, como el extracto de *Listeria*, extracto de *Listeria* carente de proteínas de unión a Rab5a, luego carente de GAPDH-LM, el péptido N-terminal N1 de la GAPDH-LM o el péptido C-terminal C1 de la GAPDH-LM. Aquellos tratamientos para los que se ha comprobado que son capaces de ADP-ribosilar a Rab5a, tales como con el extracto de *Listeria* que contiene la GAPDH-LM ó el péptido N1 de la GAPDH-LM bloquean esta reacción de fusión entre fracciones fagosómicas y endosómicas; por lo que se puede concluir que la ADP-ribosilación de Rab5a también afecta a las interacciones entre fagosomas y endosomas dependientes de dicha GTPasa.

Ejemplo 4

Ensayo de fusión fagosoma-endosoma

Los fagosomas o fracciones fagosómicas fueron obtenidas de células E-clone infectadas con ss-NHS-biotina/LM durante 15 minutos. Las fracciones endosómicas fueron obtenidas tras 10 minutos de incubación con estreptoavidina-HRP (Alvarez-Domínguez, C, Peña-Macarro, C and Prada-Delgado, A. (2003). In Intracellular pathogens in membrane interactions and vacuole biogenesis. Ed. J-P).

Las fracciones fagosómicas y endosómicas desnudas, esto es, libres de proteínas Rab (Yang C, Slepnev VI, Goud B. (1994). *J Biol Chem.* 269(50): 31891-9. Rubino M, Miaczynska, M, Lippe, R and Zerial, M. (2000). *J. Biol. Chem.*

275:3745-3748) fueron puestas en contacto con un tampón de fusión (250 mM sucrosa, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 1 mM ditioneitol o DTT, 1.5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM ATP, 8 mM creatina fosfato, 31 unidades/ml creatina fosfoquinasa, y 0.25 mg/ml avidina como bloqueante) suplementado con citosol filtrado en gel (0.5 mg/ml) y 5 µg/ml de GST-Rab5a: wt recombinante prenilada y ADP-ribosilada o no. La ADP-ribosilación fue llevada a cabo con GST-Rab5a: wt prenilada y preincubada con 10 µg/ml de: Nt-E, R5t-E, N1 o C1 durante 30 min a 37°C para permitir la unión de dicha proteína recombinante a las fracciones fagosómicas y endosómicas, lo que favorecerá la unión entre ambas que se denomina fusión. La reacción de fusión fue incubada durante 45 min a 37°C y la reacción fue detenida mediante su inmersión en hielo. Los complejos estreptoavidina-HRP/biotina-bacteria fueron recuperados por centrifugación (10,000 x g, 6 min, a 4°C) tras la solubilización de las membranas fagosómicas y endosómicas con solución tampón de tisis con baja concentración de detergente (PBS, 0,05% Triton X-100 conteniendo 0,25 mg/ml de avidina como bloqueante).

Finalmente, la fusión fue cuantificada por unidades arbitrarias de absorbancia por cantidad de proteína (unidades de absorbancia/mg) tal y como se describe en Alvarez-Domínguez, C., Barbieri, A.M., Beron, W., Wandinger-Ness, A. and Stahl, P.D. (1996). *J. Biol. Chem.* 271: 13834-13843.

Ejemplo 5

20 Búsqueda de compuestos con actividad moduladora

Gran cantidad de moléculas que afecten a la actividad de GAPDH de los géneros *Listeria* y *Mycobacterium* pueden ser creadas aleatoriamente por química combinatoria, o diseñadas específicamente para, posteriormente, ser analizadas por técnicas de high throughput screening (HTS). El empleo de HTS permite que muchos compuestos puedan ser analizados simultáneamente en paralelo, de modo que el análisis puede realizarse muy rápidamente (Houston J.G., Manks M., The chemical-biological interface: Developments in automated and miniaturised screening technology. Current Opinion in Biotechnology, Vol. 8, 1997). Generalmente, este tipo de técnicas suelen emplear las conocidas placas de 96 pocillos, del inglés 96-well microtiter plates que suelen requerir de unos volúmenes de muestra de entre 50 y 500 µl por pocillo para llevar a cabo los experimentos. Adicionalmente, el resto de instrumentos, aparatos para mecanizar el procedimiento de cargado y lectura de placas, etc. están ampliamente difundidos y están disponibles comercialmente.

En el estado de la técnica podemos encontrar gran cantidad de ensayos para la detección de interacciones proteína-proteína, que nos permitan la detección de compuestos que interaccionen con GAPDH y que puedan afectar a su actividad. Algunos ejemplos de estos estudios pueden ser encontrados en Beutel *et al.* U.S. Patent 5,976,813, Jayawickreme *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.19, 1614-18 (1994), entre otros. Algunos de los ensayos más comúnmente empleados son mencionados a continuación:

- Ensayos de interacción proteína-proteína (binding assay). En este tipo de ensayos, generalmente un péptido de pequeño tamaño es testado para comprobar la inhibición de la actividad de una proteína concreta. Este tipo de ensayos también pueden ser llevados a cabo mediante metodologías, tales como real-time Bimolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63,2338-2345, 1991, and Szabo *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705,1995).
- Ensayo de doble-híbrido (Two-hybrid screening). Este tipo de técnicas también son empleadas para la identificación de interacciones proteína-proteína (Szabo *et al.*, (1995); Zervos *et al.* (1993); Madura *et al.* 1993).
- Ensayo de unión competitiva a ligando (competitive ligand binding assay) (Timothy Zacharewski, Dept. of Biochemistry, Michigan State University, Lansing, MI, USA. October 2002. Protocol for the competitive Ligand Binding Assay).

Ejemplo 6

55 Diseño racional de fármacos

Uno de los mayores éxitos del diseño racional de drogas consiste en el hecho de poder conseguir análogos estructurales biológicamente activos, tales como polipéptidos o pequeñas moléculas que mimetizan a éstos, que pueden actuar como agonistas, antagonistas o inhibidores de determinadas moléculas o proteínas diana. Un ejemplo de estas técnicas la podemos encontrar en Zhaowen Lao *et al.* J. Chem. Inf. Comput. Sci.1996. 36, 1187-1194, "A new method for structure-based drug design").

En una primera aproximación, la estructura tridimensional de las proteínas de interés es determinada mediante cristalografía de rayos X, modelado por ordenador y más comúnmente por combinación de ambas técnicas. La información estructural que se obtiene de estos estudios va a permitir el desarrollo otras moléculas que inhiban, activen o mimeticen a la actividad de la proteína diana. Una vez producidos estos nuevos agentes son estudiados por diferentes técnicas que van a determinar la actividad de los mismos.

ES 2 298 055 A1

En concreto el extremo amino de GAPDH de *Listeria* y *Mycobacterium* tiene una estructura tridimensional predecible, siendo la primera porción de 1-8 aminoácidos una estructura en lamina-beta y los siguientes 12 a 22 aminoácidos una alfa-hélice. Estos datos unidos al hecho de que en esta región de la enzima reside la actividad ADP-ribosilante puede ser de gran ayuda para el diseño de fármacos o sustancias moduladoras de esta actividad, tal y como se realiza en Suresh, S., Bressi, J. C., Kennedy, K. J., Verlinde, C. L., Gelb, M. H. and Hol, W. G., "Conformational changes in *Leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed", inhibitors *J. Mol. Biol.* 309 (2), 423-435 (2001) y Kim, H., Feil, I. K., Verlinde, C. L., Petra, P. H. and Hol, W. G., "Crystal structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site", *Biochemistry* 34 (46), 14975-14986 (1995) para el dominio NAD de GAPDH de *Leishmania mexicana*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado inmunogénico frente a los géneros *Listeria* y *Mycobacterium* seleccionado del grupo que comprende:

- a) Polipéptido cuya secuencia comprende la SEQ ID N° 1.
- b) Polipéptido cuya secuencia comprende fragmentos de la SEQ ID N° 1 que comprendan cualquiera de las secuencias SEQ ID N° 2 o 3.
- c) Polipéptido cuya secuencia tiene al menos un 85% de homología con cualquiera de los polipéptidos descritos en a) o b).

2. Polipéptido inmunogénico aislado según la reivindicación anterior cuya secuencia presenta al menos un 90% de homología con cualquiera de los polipéptidos de la reivindicación 1.

3. Polipéptido inmunogénico aislado según la reivindicación 1 cuya secuencia presenta al menos un 95% de homología con cualquiera de los polipéptidos de la reivindicación 1.

4. Polipéptido inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 cuya secuencia es la SEQ ID N° 1.

5. Polipéptido inmunogénico aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 cuya secuencia es la SEQ ID N° 2.

6. Polipéptido inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 cuya secuencia es la SEQ ID N° 3.

7. Polipéptido derivado de cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones 1-6.

8. Polinucleótido aislado capaz de codificar para cualquiera de los polipéptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

9. Un anticuerpo aislado o fragmentos del mismo capaces de reconocer cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones 1-7.

10. Polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, fusionado o unido químicamente a un péptido, polipéptido o proteína adicional.

11. Un vector de expresión o sistema de expresión que comprende una polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8.

12. Una célula hospedadora aislada, procariota o eucariota, transformada, o transfectada con un polinucleótido de la reivindicación 8 o con un vector o sistema de expresión de la reivindicación 11.

13. Método para elaborar un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 mediante técnicas de ADN recombinante o síntesis química.

14. Método para elaborar un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende:

- a. Cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 12 en condiciones tales que:
- b. Se exprese cualquiera de los polinucleótidos según la reivindicación 8.
- c. Aislar el polipéptido obtenido en el paso a anterior.

15. Un polipéptido o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso como medicamento.

16. Vacuna que comprende un polipéptido o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

17. Uso de un polipéptido o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la elaboración de una vacuna capaz de inmunizar frente bacterias pertenecientes al género *Listeria*.

18. Uso de un polipéptido o fragmento del mismo según la reivindicación anterior para la elaboración de una vacuna capaz de inmunizar frente a *Listeria Monocitogenes*.

19. Uso de un polipéptido o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la elaboración de una vacuna capaz de inmunizar frente bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*.

ES 2 298 055 A1

20. Uso de un polipéptido o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la elaboración de una vacuna capaz de inmunizar frente a *Mycobacterium Tuberculosis*.

5 21. Uso del dominio de ADP-ribosilación de la GAPDH de cualquiera de los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*, definido según cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones 1-7, para el diseño racional de drogas.

10 22. Uso de un anticuerpo aislado o fragmento del mismo según la reivindicación 8 para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección producida por bacterias pertenecientes a cualquiera de los géneros *Listeria* y *Mycobacterium*.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURAS

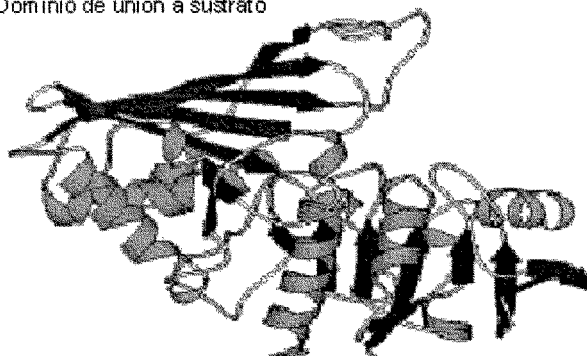
Fig.1a

MTVRVGINGF	GRIGRNFYRA	LLAQQEQGTA	DVEVVAANDI
TDNSTLAHLL	KFDSILGRLP	CDVGLEGDDT	IVVGRAKIK
LAVREGPAAL	PWGD LGVDV	VESTGLFTNA	AKAKGHLDAG
AKKVIISAPA	TDEDITIVLG	VNDDKYDGSQ	NIISNASCTT
NCLAPLAKVL	DDEFGIVKGL	MTTIHAYTQD	QNLQDGPHKD
LRRARAAALN	IVPTSTGAAK	AIGLVMPQLK	GKLDGYALRV
POPTGSVTDL	TVDLSTRASV	DEINAAFKAA	AEGRLKGILK
YYDAPIVSSD	IVTDPHSSIF	DSGLTKVIDD	QAKVVSWDN
EWGYSNRLVD	LVTLVGKSL		

MTVKVGINGF	GRIGRLAFRR	IQNVEGIEVV	AINDLTDAM
LAHLLKYDTT	QGRFDGEVEV	HDGFFNVNGK	EVKVLANRNP
EELPWGDLGV	DIVLECTGFF	TAQDKAELHI	KAGAKKVVIS
APATGDMKTI	VYNVNHETLD	GTETVISGAS	CTTNCLAPMA
KVLEDKFGVV	EGLMTTIHAY	TGDQNTLDAP	HPKGDFRRAR
AAAENIIPNT	TGAAKAIGEV	LPTLKGKLDG	AAQRVPVPTG
SLTELVTVLD	KKVTVDEVNA	AMEAASDPET	FGYTSDQVVS
SDIKGMTFGS	LFDETQTKVL	TVGDQQLVKT	VAWYD <u>NEMSY</u>
<u>TKAQLVRTLE</u>	<u>YFAKIAK</u>		

Fig. 1b

Dominio de unión a sustrato



Dominio de unión de NAD

Fig. 2

<i>L. monocytogenes</i>	MTVKVGIIIGF GRIGRLAFRR IQNVEGIEVV....
<i>M. tuberculosis</i>	<u>MTVRVGIIIGF GRIGRNFYRA LLAQQEQGTA....</u>
<i>M. avium</i>	<u>MTVRVGIIIGF GRIGRNFYRA LLAQQEQGTA....</u>
<i>M. leprae</i>	<u>MTVRVGIIIGF GRIGRNFYRA LLAQQEHGIA....</u>
<i>M. bovis</i>	<u>MTVRVGIIIGF GRIGRNFYRA LLAQQEQGTA....</u>
<i>S. pyogenes</i>	MVVKVGINGF GRIGRLAFRR IQNIEGVEVT....
<i>S. aureus</i>	MAVKVAINGF GRIGRLAFRR IQEVEGLEVV....
<i>P. aeruginosa</i>	MTIRLAINGF GRIGRNVLRA LYTGHYREQL....
<i>Homo sapiens</i>	MGKVKVGNGF FGRIGRLVTR AAFNSGKVDI....
<i>Mus musculus</i>	MVKVGNGFG RIGRLVTRAA ICSGKVEIVA....

Fig. 3

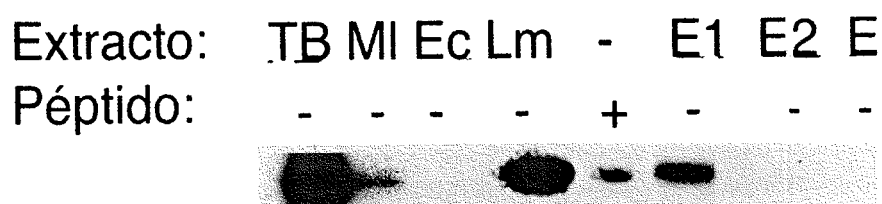


Fig. 4

A

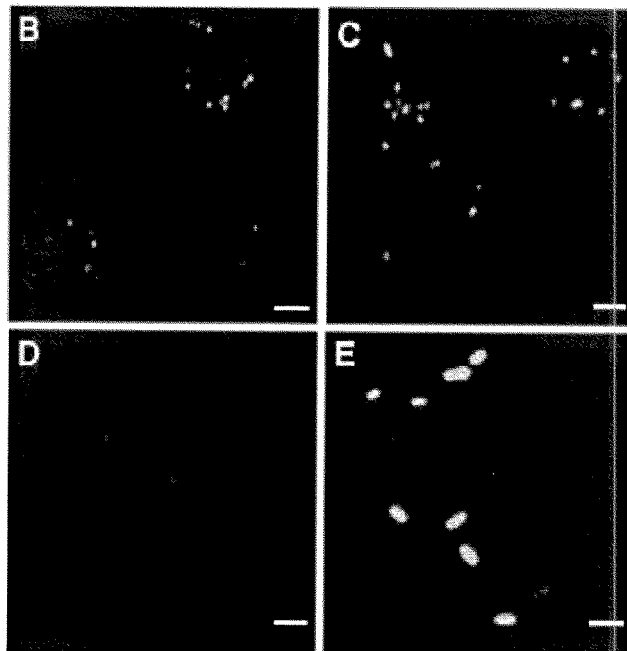
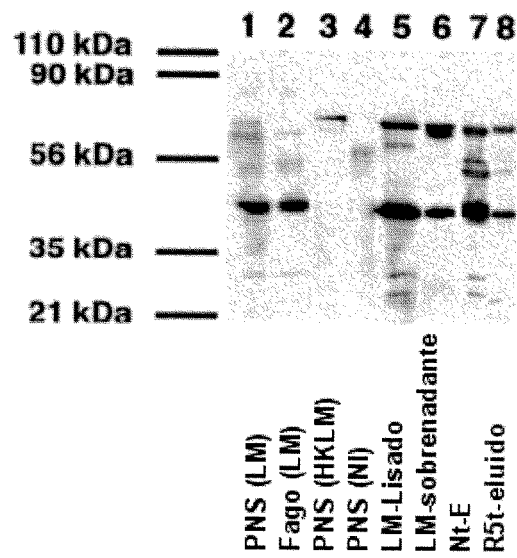


Fig. 5

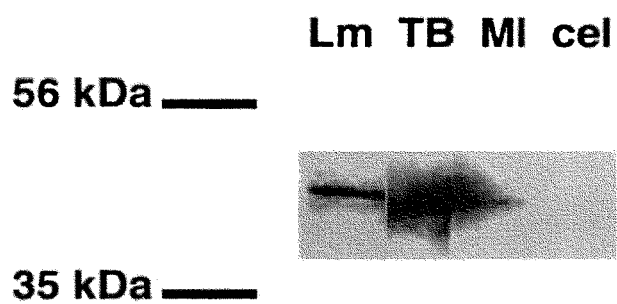
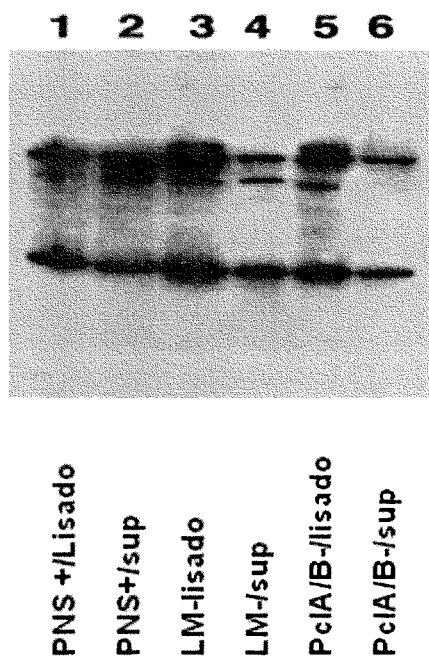
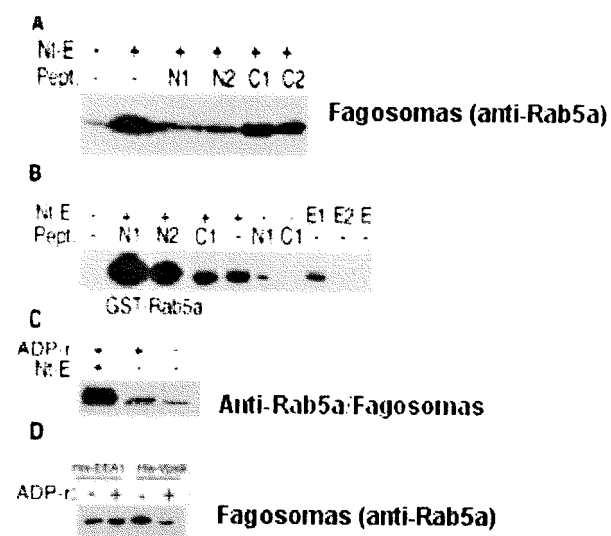


Fig. 6

Fig. 7



ES 2 298 055 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Fundación Marqués de Valdecilla
- 5 <120> PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS FRENTE A LOS GÉNEROS *LISTERIA* Y *MYCOBACTERIUM*, ANTI-CUERPOS Y USOS DE LOS MISMOS.
- <130> ES1625.1
- 10 <160> 4
- <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
<211> 22
<212> PRT
20 <213> *Listeria Monocitogenes*
- <400> 1
- 25 Met Thr Val Lys Val Gly Ile Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Leu
1 5 10 15
Ala Phe Arg Arg Ile Gln
20
- 30 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
35 <213> *Listeria Monocitogenes*
- <400> 2
- 40 Met Thr Val Lys Val Gly Ile Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg
1 5 10 15
- <210> 3
45 <211> 15
<212> PRT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*
- 50 <400> 3
- Met Thr Val Arg Val Gly Ile Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg
1 5 10 15
- 55 <210> 4
<211> 22
<212> PRT
60 <213> *Listeria Monocitogenes*
- <400> 4
- 65 Asn Glu Met Ser Tyr Thr Lys Ala Gln Leu Val Arg Thr Leu Glu Tyr
1 5 10 15
Phe Ala Lys Ile Ala Lys
20



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 298 055

⑫ Nº de solicitud: 200602175

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 09.08.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20060078901 A1 (FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER) 13.04.2006, página 66, SEQ ID NO 1515; página 6, párrafos 0072-0079; página 9, párrafos 0140-0150; página 10, párrafos 0151-0165; página 11, párrafo 0170; página 14, párrafos 0233-0240.	1-20,22
A	PUBLICACION DEL GENOMA. 27.12.2003, todo el documento. [en línea] [recuperado el 30.11.2007] Recuperado de Internet: http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-3/B_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm	1-20,22
A	LI L. et al. The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, Vol 102 (35), páginas 12344-12349, página 12347, columnas 1-2.	1-20,22
A	ALVAREZ HERRERA AH. Mono-ADP-ribosilación: Implicación en la Fisiología de los Organismos. Revista de Educación Bioquímica. 2004, Vol 23 (4), páginas 149-156, página 150, columnas 1-2; página 151, columna 3; página 155, columna 1.	21

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

01.04.2008

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)