

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
16 de Diciembre de 2004 (16.12.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/108915 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: **C12N 9/52**,
15/12, 15/57, C07K 14/82

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2004/070039

(22) Fecha de presentación internacional:
3 de Junio de 2004 (03.06.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200301348 6 de Junio de 2003 (06.06.2003) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [—/ES]; CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, C/ SERRANO, 117, E-28006 MADRID (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **FERNÁNDEZ HERRERO, Luis, Angel** [ES/ES]; CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, CAMPUS DE CANTOBLANCO, E-28049 MADRID (ES). **DE LORENZO PRIETO, Victor** [ES/ES]; CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, CAMPUS DE CANTOBLANCO, E-28049 MADRID (ES). **VEIGA CHACON, Esteban** [ES/ES]; CENTRO

NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, CAMPUS DE CANTOBLANCO, E-28049 MADRID (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: FUSION PROTEIN CONTAINING A DIMERISATION DOMAIN AND AN AUTOTRANSPORTER DOMAIN

(54) Título: AGREGACION ESPECIFICA DE BACTERIAS MEDIANTE LA EXPRESION EN SUPERFICIE DE PROTEINAS DE FUSION

(57) Abstract: The invention relates to fusion proteins containing the β -autotransporter domain of the IgA protease of *Neisseria gonorrhoea* and the leucine zippers of the Jun and Fos eukaryotic transcription factors. The invention also relates to a method of generating the aforementioned proteins and to the uses of same.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a proteínas de fusión conteniendo el dominio (3-autotransportador de la IgA) proteasa de *Neisseria gonorrhoea* y las cremalleras de leucina de los factores de transcripción eucarióticos de Jun y de Fos, a un método de generación de las mismas y usos de estas.



WO 2004/108915 A1

TITULO

AGREGACIÓN ESPECÍFICA DE BACTERIAS MEDIANTE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN.

5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las bacterias se adhieren frecuentemente a dianas moleculares mediante la presencia de estructuras proteicas sobre su superficie celular, con distintas capacidades de unión de superficie.

10

Algunas potentes adhesinas encontradas en una variedad de patógenos Gram-negativos pueden, sin embargo, ser ancladas directamente a la membrana externa, por lo tanto el resultado de esta unión es un íntimo contacto entre la

15

diana y la célula.

Una clase principal de dichas adhesinas son presentadas sobre la superficie celular mediante un sistema de secreción proteica conocido como autotransportadores

20

(Henderson et al., Trends Microbiol. 1998, 6: 370-8). Ejemplos de este tipo incluyen proteínas de *Salmonella* entérica - ShdA, MisL - (Mol. Microbiol. 2002, 43: 895-905; Infect Immunol, 2000, 68: 2720-7), *Rickettsia rickettsii* - rOmpA - (Microb. Pathol. 1998, 24: 289-98), *Bordetella*

25

species - pertactin, Vag8 - (Nature 1996, 381: 90-2; Infect. Immunol. 1998, 66: 3985-9), *H. influenzae* - Hap, Hia, Hsf - (Infect. Immunol. 2002, 70: 4902-7; Mol. Microbiol. 2002, 46: 731-43; Microbiology 2001, 147: 250-2), entre otros.

30

Dependiendo del caso, dichas proteínas dotan a la bacteria de la habilidad de pegarse a superficies, o a interactuar con otras bacterias en biofilms.

35

Tres dominios distintos pueden ser identificados para casi todos los autotransportadores: un dominio amino terminal, la proteína que será presentada sobre la superficie celular llamado dominio pasajero, y un dominio carboxi-terminal

llamado transportador o dominio β , el cual dirige la secreción a través de la membrana externa.

5 Fos y Jun son factores de transcripción eucarióticos que tienen la habilidad intrínseca de heterodimerizar a través de sus cremalleras de leucinas. Es conocido que Jun puede formar tanto heterodímeros como homodímeros por unión de las cremalleras de leucinas Jun-Jun.

10 Muchos polipéptidos pasajeros han sido expuestos sobre la superficie celular fusionados al dominio β de diferentes miembros de la familia de autotransportadores, como por ejemplo la metalotioneína de rata (Nat. Biotechnol. 2000, 18: 661-5), la subunidad B de la toxina del cólera (J. Bacteriol. 1997, 794-704), β -lactamasa (J. Bacteriol. 2000, 15 182: 3726-33), la adrenotoxina bovina (J. Biotechnol. 2002, 95: 257-68), la carboxilesterasa EstA de *Burkholderia gladioli* (J. Mol. Catal. B: Enzymatic 2002, 18: 89-97), la proteína fimbrial FimH (J. Bacteriol. 2002, 184: 4197-204), 20 entre otros.

Hasta la fecha no han sido descritas proteínas de fusión conteniendo un dominio transportador de la familia de los autotransportadores y un dominio de dimerización.

25 Y en concreto, no han sido descritas proteínas de fusión conteniendo el dominio β -autotransportador de la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoeae* y las cremalleras de leucina de los factores de transcripción eucarióticos de Jun y de Fos.

30 Cuando dichas proteínas híbridas fueron expresadas en células de *E. coli*, éstas adquirieron nuevas propiedades adherentes específicas resultantes de la auto-asociación y 35 agrupamiento a otras bacterias.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con un modo de realización de la presente invención, se han reprogramado las propiedades de adhesión de bacterias mediante la exposición en su superficie de una proteína híbrida con potencial actividad adherente, la cual se une a su contraparte en otra bacteria.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión que se expresa sobre la superficie de la membrana externa de bacterias caracterizada porque comprende un dominio de dimerización como dominio pasajero y un dominio transportador de la familia de los autotransportadores.

De acuerdo con un modo de realización particular de la presente invención, ésta proporciona una proteína de fusión conteniendo el dominio β -autotransportador de la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoeae*, y las cremalleras de leucina de los factores de transcripción eucarióticos Jun o Fos (Jun β o Fos β).

Según un modo de realización preferido de la presente invención se proporciona una proteína de fusión que comprende la cremallera de leucina del factor de transcripción eucariótico de Jun como dominio pasajero.

En otro modo de realización preferido de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión que comprende la cremallera de leucina del factor de transcripción eucariótico de Fos como dominio pasajero.

De acuerdo con otro modo de realización de la presente invención, la proteína de fusión proporcionada comprende un péptido señal que lo transporta al periplasma, un dominio de dimerización como dominio pasajero y un dominio transportador de la familia de los autotransportadores.

De acuerdo con otro modo de realización particular de la presente invención, la estructura de las proteínas híbridas derivadas de la IgA proteasa de *N. Gonorrhoeae* es la siguiente, empezando desde el N-terminal: el péptido señal de PelB (ss), que es quien dirige el paso de las proteínas híbridas hacia el periplasma, el dominio pasajero, un epítipo (E-Tag) que permite la inmunodetección y el dominio transportador de la IgA proteasa de *N. Gonorrhoeae*, que dirige la secreción del dominio pasajero hacia el medio extracelular.

En otro aspecto de la presente invención, ésta proporciona un método de agregación bacteriana dirigida que comprende la expresión, en la superficie de la membrana externa de éstas, de una proteína de fusión que comprende un dominio de dimerización como dominio pasajero y un dominio transportador de la familia de los autotransportadores, consiguiéndose la unión bacteriana gracias la formación de dímeros entre bacterias que expresan Jun β y Fos β o Jun β únicamente.

Según otro aspecto de la presente invención, ésta proporciona un método de agregación bacteriana dirigida que comprende la expresión, en la superficie de la membrana externa de éstas, de una proteína de fusión que comprende el dominio β -autotransportador de la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoea* y un dominio pasajero seleccionado entre el grupo consistente en la cremallera de leucina del factor de transcripción Jun y la cremallera de leucina del factor de transcripción Fos, consiguiéndose la unión bacteriana gracias la formación de dímeros entre bacterias que expresan Jun β y Fos β o Jun β únicamente.

De acuerdo con un modo de realización preferido de la presente invención, el método de agregación bacteriana dirigida descrito anteriormente comprende un cultivo de bacterias que expresan Jun β .

De acuerdo con otro modo de realización preferido de la presente invención, el método de agregación bacteriana dirigida comprende un cultivo de una población mixta de bacterias que expresan Fos β y Jun β .

5

Según otro modo de realización preferido de la presente invención, el método de agregación bacteriana dirigida consiste en que a un cultivo de bacterias que expresan Fos β se le adiciona otro cultivo distinto expresando Jun β .

10

De acuerdo con otro modo de realización particular, la presente invención proporciona un método de agregación bacteriana dirigida el cual se logra mediante la adición de un inductor que activa la expresión de los dominios Fos y Jun en la superficie de las bacterias, uniéndose éstos dominios a su contraparte presente en otra bacteria.

15

En un modo de realización particular de la presente invención, la expresión de las proteínas de fusión en la membrana externa está controlada por el promotor del operon *lac* de *E. coli* (*Plac*), por lo que dicha inducción puede conseguirse añadiendo IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) al medio de cultivo, por lo que la presente invención proporciona un método de agregación bacteriana dirigida mediante la adición de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) para la inducción de la expresión de los dominios Fos y Jun en la superficie de las bacterias, uniéndose éstos dominios a su contraparte presente en otra bacteria.

20

De acuerdo con otro modo de realización particular de la presente invención, la expresión de las proteínas de fusión en la membrana externa está controlada por el promotor *Pm*, por lo que dicha inducción puede conseguirse añadiendo 3-metil benzoato al medio de cultivo, por lo que la presente invención proporciona un método de agregación bacteriana dirigida el cual se logra mediante la adición de 3-metil benzoato para la inducción de la expresión de los dominios

25

30

35

Fos y Jun en la superficie de las bacterias, uniéndose éstos dominios a su contraparte presente en otra bacteria.

5 Según otro modo de realización de la presente invención, se proporciona un plásmido el cual comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO 5, una secuencia de nucleótidos la cual tiene una identidad superior al 80% a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 5 y fragmentos de nucleótidos de SEQ ID NO 5.

10 En otro modo de realización particular, el plásmido expresa la fusión de la cremallera de leucina de *fos* al dominio β de la IgA proteasa bajo el control del promotor *lac*.

15 En otro modo de realización más preferido, el plásmido es pFos β de SEQ ID NO 5.

20 Según otro modo de realización de la presente invención, se proporciona un plásmido el cual comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO 6, una secuencia de nucleótidos la cual tiene una identidad superior al 80% a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 6 y fragmentos de nucleótidos de SEQ ID NO 6.

25 En otro modo de realización particular, el plásmido expresa la fusión de la cremallera de leucina de *jun* al dominio β de la IgA proteasa bajo el control del promotor *lac*.

30 En otro modo de realización más preferido, el plásmido es pJun β de SEQ ID NO 6.

35 En otro aspecto de la presente invención, ésta proporciona un método de agregación bacteriana dirigida caracterizado porque a un cultivo de bacterias que contienen un plásmido seleccionado entre el grupo formado por el plásmido pJun β , el plásmido pFos β o una mezcla de ambos, se le añade una cantidad suficiente de un inductor adecuado para la inducción de Jun β y/o Fos β en la superficie de la membrana

externa de dichas bacterias.

En otro aspecto de la presente invención, ésta proporciona un método de agregación bacteriana dirigida caracterizado porque a un cultivo de bacterias que contienen un plásmido seleccionado entre el grupo formado por el plásmido pJun β , el plásmido pFos β o una mezcla de ambos, se le añade una cantidad suficiente de IPTG para la inducción de Jun β y/o Fos β en la superficie de la membrana externa de dichas bacterias.

De acuerdo con un modo de realización preferido de la presente invención, ésta proporciona un método de agregación bacteriana dirigida caracterizado porque a un cultivo de bacterias que contienen el plásmido pJun β , se le añade una cantidad suficiente de IPTG para la inducción de Jun β en la superficie de la membrana externa de dichas bacterias.

De acuerdo con otro modo de realización preferido de la presente invención, ésta proporciona un método de agregación bacteriana dirigida caracterizado porque a un cultivo que contiene bacterias que contienen el plásmido pJun β y bacterias que contienen el plásmido pFos β , se le añade una cantidad suficiente de IPTG para la inducción de Jun β en la superficie de la membrana externa de dichas bacterias.

Por lo tanto, una posible aplicación de la presente invención sería recolectar bacterias procedentes de un cultivo en suspensión induciendo la agregación de dichas bacterias en cúmulos que precipitan al fondo de la solución de donde se recogerían por decantación o por cualquier otro método apropiado. La agregación se logra mediante la adición de un inductor que activa la expresión de los dominios Fos y Jun en la superficie de las bacterias, estos dominios se unen entre sí y provocan que las bacterias formen grandes cúmulos que precipitan. Este método sería

una alternativa a los métodos al uso para recolectar bacterias basados en centrifugación o filtración.

Una variante de este método sería añadir a un cultivo de bacterias que expresan Fos otro cultivo distinto expresando Jun. De esta manera la precipitación sería instantánea ya que no habría que esperar a la expresión de los dominios porque estos están ya presentes en los cultivos por separado.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, ésta proporciona el uso de una proteína de fusión que comprende un dominio pasajero seleccionado entre el grupo consistente en la cremallera de leucina del factor de transcripción de Jun y la cremallera de leucina del factor de transcripción de Fos y el dominio transportador de la IgA proteasa de *Neisseria gonorrhoeae* en la recolección de bacterias procedentes de un cultivo en suspensión induciendo la agregación de dichas bacterias mediante la adición de un inductor que activa la expresión de los dominios Fos β y Jun β en la superficie de las bacterias.

En un modo de realización preferido de la presente invención, se proporciona el uso de dicha proteína de fusión donde la agregación se logra mediante la adición de IPTG el cual activa la expresión de los dominios Fos y Jun en la superficie de las bacterias, con lo que se consigue la formación de heterodímeros y/o homodímeros entre los dominios de las cremalleras de leucina de Jun y de Fos presentes en bacterias distintas.

En un modo de realización preferido de la presente invención, se proporciona el uso de dicha proteína de fusión donde la agregación se logra mediante la adición de 3-metil benzoato el cual activa la expresión de los dominios Fos y Jun en la superficie de las bacterias, con lo que se consigue la formación de heterodímeros y/o

homodímeros entre los dominios de las cremalleras de leucina de Jun y de Fos presentes en bacterias distintas.

La expresión de Jun y Fos puede ser inducida con 3-metil benzoato cuando estos dominios están presentes en plásmidos en los que su expresión queda bajo el control del promotor *P_m*, como por ejemplo en pCNBFos β y pCNBJun β .

En el método de generación de dichos plásmidos se siguió el siguiente protocolo: los plásmidos pFos β y pJun β se digirieron con NotI y los fragmentos de 1620 pb que contienen los genes de las proteínas híbridas Fos β y Jun β se clonaron en pCNB1 (de Lorenzo V. et al., Gene 1993, 123(1):17-24) digerido con NotI, dando lugar a los plásmidos pCNBFos β y pCNBJun β .

Así, la expresión de Fos β y Jun β quedó bajo el control de promotor *P_m*, un promotor regulable e inducible con 3-metil benzoato.

De acuerdo con otra forma de realización preferida de la presente invención, ésta proporciona un método de generación de proteínas de fusión que comprende un dominio de dimerización como dominio pasajero y un dominio transportador de la familia de los autotransportadores, el cual consiste en la amplificación por PCR de segmentos de ADN correspondientes a los dominios de dimerización, con cebadores adecuados de dichos dominios de dimerización, seguido de la digestión con SfiI y clonación de los productos resultantes del PCR en el mismo sitio que el plásmido pMT β -1.

Según otra forma de realización aún más preferida de la presente invención, se proporciona un método de preparación de proteínas de fusión que comprende un dominio pasajero seleccionado entre el grupo consistente en la cremallera de leucina del factor de transcripción de Jun y la cremallera de leucina del factor de transcripción de Fos y el dominio

transportador de la IgA proteasa de *Neisseria gonorrhoeae* que consiste en la amplificación por PCR de los segmentos de ADN correspondiente a *fos* y *jun* con los cebadores de SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4; para
5 posteriormente realizar la digestión con *SfiI* y clonación de los productos resultantes del PCR en el mismo sitio que el plásmido pMT β -1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

Fig.1. Estructura de las proteínas híbridas Fos β y Jun β .

A. Organización de los insertos de plásmidos pFos β y pJun β codificando los híbridos Fos β y Jun β respectivamente. La posición del péptido señal PelB (ss), el epítipo E-Tag, las
15 cremalleras de leucina y los segmentos del gen *iga* β son indicados, así como el promotor *lac* (plac). B. Topología putativa de cualquiera de los dos híbridos Fos β y Jun β en la membrana externa bacteriana, con sus cremalleras de leucina expuestas al medio externo. C. Interacciones putativas
20 entre dos bacterias expresando las proteínas Fos β y Jun β .

Fig.2. Expresión de Fos β y Jun β en la cepa de *E. coli* UT5600.

A. *Immunoblot* de extractos proteicos de células enteras de
25 cultivos inducidos expresando Fos β (1) o Jun β (2) o no transformados (3). El *blot* fue incubado con anticuerpos monoclonales anti E-Tag. Conjugado de Streptavidina-peroxidasa fue también añadido para detectar las proteínas estándar biotiniladas (M). B. Accesibilidad del
30 peptidoglicano de las mismas células inducidas de *E. coli*. Las señales obtenidas sobre células intactas, usando un suero anti-peptidoglicano, se presentan de forma comparativa con aquellas obtenidas sobre células lisadas tomado como 100%. Células de *E. coli* no transformadas
35 fueron tomadas como control.

Fig.3. Localización externa de los dominios pasajeros Fos β y Jun β .

A. Bacteria intacta expresando Fos β y Jun β , o no transformadas (control) fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti E-tag por inmunofluorescencia indirecta. La unión del anticuerpo monoclonal anti E-Tag a los
5 epítomos de superficie expuestos fue detectada usando como anticuerpo secundario un suero anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 (en rojo). Esta imagen es el resultado de la superposición de la imagen de contraste, en la cual se detectan todas las bacterias, y de la imagen de
10 inmunofluorescencia en la cual solo aquellas que expresan el antígeno sobre su superficie fueron detectadas. B. Células de *E. coli* expresando Fos β y Jun β fueron incubadas (+) o no (-) con tripsina (1 μ g/ml). La digestión de los módulos expuestos de Fos β y Jun β fue seguida por Western
15 blots usando el anticuerpo monoclonal anti E-Tag. C. Cuantificación de presencia de Fos β y Jun β sobre la superficie de células intactas de *E. Coli* mediante ELISA. Los valores mostrados son la media de tres experimentos independientes y representan el porcentaje de la señal
20 producida por células intactas (lavadas en PBS) con respecto al valor obtenido con un número idéntico de células lisadas.

Fig. 4. Adhesión celular específica dada por la interacción
25 de los dominios de dimerización de cremalleras de leucina. A. Las muestras de células inducidas de *E. coli* que expresan Fos β , Jun β o una mezcla del mismo número de células de ambas poblaciones (Fos β +Jun β) fueron inoculadas a la misma DO₆₀₀ en tres tubos estériles diferentes sin
30 agitación. La foto fue tomada después de 90 minutos. B. Cinética de Densidad Óptica (DO) de muestras tratadas como en A. Las muestras examinadas fueron células de *E. coli* que expresan Fos β , Jun β , HE β o una mezcla de células que expresan Jun β con el mismo número de células que expresan
35 Fos β (Jun β + Fos β) o HE β (Jun β + HE β). La DO fue medida en muestras tomadas a aprox. 1cm de la superficie. La DO inicial de los cultivos, justo antes de la inducción, fue tomada como 100%. C. Las imágenes de microscopía de

contraste de fase de células inducidas de *E. coli* colocadas sobre el portaobjetos del microscopio sin agitación después de 90 minutos.

5 Fig. 5. Representación gráfica de la adherencia específica de células de bacteria conducidas por la interacción dimérica de las cremalleras de leucina expuestas sobre la superficie bacteriana por la maquinaria del autotransportador.

10 La imagen ampliada representa el complejo oligomérico autotransportador en la superficie bacteriana con los dominios pasajeros (cremalleras de leucina) expuestos al medio extracelular y mostrando adherencia a su contraparte
15 presente en otra bacteria.

Fig. 6. Secuencia de pFos β .

Fig. 7. Secuencia de pJun β .

20

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran un modo de realización de la presente invención, no considerándose en modo alguno limitativos de la misma.

25

Ejemplo 1. Preparación de los plásmidos.

30 *Escherichia coli* UT5600 ($\Delta ompT$ *proC* *leu-6* *trpE38* *entA*) conteniendo pFos β y pJun β fueron incubadas a 37 °C en placas de agar LB conteniendo glucosa 2% y Cm (40 $\mu\text{g ml}^{-1}$) o inoculado en el mismo medio líquido. Para la inducción, los cultivos fueron ajustados a una DO₆₀₀ de 0.5 en medio líquido LB sin glucosa, se añadió 0.5 mM de IPTG y se incubó durante 3h a 37 °C.

35

Las secuencias de las cremalleras de leucina de *jun* y de *fos* fueron amplificadas mediante PCR a partir del plásmido pJUFO, descrito en Gene 1993, 137: 69-75.

Los segmentos de ADN correspondientes a *fos* fueron amplificados con los cebadores Fos1 y Fos2 de SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 respectivamente. Los cebadores Jun1 y Jun2 de
5 SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 fueron similarmente utilizados para la amplificación de *jun*.

Los productos resultantes de la PCR fueron digeridos con SfiI y clonados en el mismo sitio del plásmido pMT β -1
10 (Cm^r). Los plásmidos así originados fueron llamados pFos β y pJun β . Estos expresan, respectivamente, fusiones de las cremalleras de leucina de *fos* y de *jun*, al dominio β de la IgA proteasa bajo el control del promotor *lac*. El plásmido control pHE β expresa una proteína de fusión entre
15 un péptido de 6 histidinas y el dominio β de la proteasa IgA.

Las secuencias de los plásmidos pFos β y pJun β son SEQ ID NO 5 (Fig. 6) y SEQ ID NO 6 (Fig. 7), respectivamente
20

Ejemplo 2. Microscopía de Inmunofluorescencia.

Para la detección del epítipo E-Tag sobre la superficie de células de *E. coli*, la bacteria fue lavada con PBS y fijada
25 en el mismo tampón conteniendo 3% de paraformaldehído. 80 μ l de dicha suspensión celular fue colocado durante 1 hora sobre placas de cristal recubiertas con poli-L-lisina (1 mg ml⁻¹). Los portaobjetos de cristal fueron bloqueados durante 40 minutos en tampón B (PBS con 3% de BSA). Las
30 muestras fueron entonces incubadas durante 1 hora en el mismo tampón con un anticuerpo monoclonal anti-E-tag (Amershan Pharmacia Biotech, 10 μ g ml⁻¹) Cada espécimen fue entonces lavado 5 veces con PBS y posteriormente incubado durante 1 hora con un suero anti-IgG de ratón conjugado con
35 Cy3 (Amershan Pharmacia Biotech) diluido a 1:100 en tampón B. Las células fueron entonces examinadas con microscopio de epifluorescencia como se describe en Mol. Microbiol. 1999, 33: 1232-43.

Ejemplo 3. Western-blot

Para la monitorización de la presencia de las proteínas híbridas en extractos celulares, muestras de proteínas desnaturalizadas fueron empleadas como muestra para SDS-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas fueron añadidas sobre membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P, Millipore) e incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-E-Tag conjugado con peroxidasa (Amershan Pharmacia). Las membranas fueron reveladas con una reacción de quimioluminiscencia y expuestas a un film de rayos X. El análisis de accesibilidad de proteasa fue llevado a cabo como se indica en EMBO J., 2002, 2122-31.

La figura 2A muestra los western blots correspondientes a extractos de células completas de *E. coli* transformadas con los plásmidos pFos β y pJun β e inducidas con IPTG. Bandas del tamaño esperado para las proteínas híbridas fueron claramente producidas cuando los blots fueron incubados con mAb anti E-Tag. Estas bandas eran bien definidas, sin indicación de inestabilidad o degradación proteolítica.

Ejemplo 4. ELISA

El nivel de las cremalleras de leucina-E-tag sobre la superficie celular fue cuantificado mediante ELISA del siguiente modo. Para células intactas, cultivos de *E. coli* fueron cosechados, lavados en PBS y resuspendidos en el mismo tampón a una DO₆₀₀ final de 2.0. Alternativamente, las bacterias fueron resuspendidas en PBS con EDTA 20 mM y lisadas por sonicación. Tanto las células intactas como las lisadas fueron unidas a las placas de ELISA (Maxisorb, Nunc) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron entonces bloqueadas con leche desnatada al 3% en PBS durante 1 hora, aclaradas en PBS y se añadió 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de anticuerpo monoclonal anti-E-tag. Las placas fueron lavadas 3 veces antes de la incubación con peroxidasa

conjugada con anti-ratón IgG (0.3 unidades ml⁻¹, Boheringer Mannheim). Los ELISA fueron revelados usando o-fenil-N-diamina (OPD, Sigma).

Un protocolo similar fue utilizado para ensayar la accesibilidad del peptidoglicano en *E. coli* expresando proteínas híbridas. En este caso, un suero de conejo anti-peptidoglicano de *E. coli* fue utilizado a una dilución 1:1000, seguido de tratamiento con una dilución 1:500 de conjugado proteína A-peroxidasa (Roche).

Tal y como se muestra en la Figura 2B, el mismo nivel de detección de peptidoglicano fue observado en células control de *E. coli* (no transformadas) que en aquellas expresando los híbridos Fosβ y Junβ. Este resultado indica que la producción de los híbridos no altera la integridad de la membrana externa.

Ejemplo 5. Ensayo de agregación celular.

Cultivos líquidos de *E. coli* conteniendo los plásmidos pFosβ y pJunβ se crecieron separadamente a una DO₆₀₀ de 0.5 y entonces fueron inducidos con IPTG 0.5 mM durante 3 horas a 37 °C bajo agitación a 180 rpm. Después de ello, se tomaron alícuotas de 5 ml de cada cultivo, se transfirieron a tubos de ensayo de 10 ml, y se dejaron crecer sin agitación. Muestras de 100 µl fueron tomadas a intervalos de 20 minutos de la parte superior de cada tubo para medir su DO₆₀₀.

Adicionalmente, se tomaron muestras inducidas para su examen en microscopio. Al final, 15 µl de cultivos fueron depositados sobre la superficie de una placa de microscopio cubierta con una fina capa de agarosa 1% en tampón tris 50 mM pH 7.5 con el fin de inmovilizar las bacterias y se incubaron a 37 °C durante 1 hora en atmósfera saturada de agua, para posteriormente ser observados por microscopía (contraste de fase).

Tal y como se observa en la Figura 4A, 90 minutos después de la inducción células de *E. coli* expresando Fos β permanecieron en suspensión, mientras que las mismas células conteniendo el plásmido pJun β sedimentaron espontáneamente, disminuyendo rápidamente el DO₆₀₀ del cultivo de 2.2 a 0.3 (Figura 4B). Esta disminución del DO₆₀₀ se acompañó de un precipitado bacteriano. Precipitado que desapareció al agitar, recuperando la misma DO₆₀₀ que la del cultivo expresando Jun β .

Para la determinación de si la agregación observada en una mezcla de bacterias expresando tanto Jun β como Fos β , fue debida a interacciones específicas entre las cremalleras de leucina de Fos y de Jun y no a un efecto inespecífico de las bacterias expresando Jun β , se llevó a cabo un experimento similar usando como control una proteína de fusión desprovista de cremalleras de leucina (HE β). Esta proteína de fusión consiste en un segmento de poli-His fusionado a un dominio β de la proteasa IgA. Las células que expresaban este control, permanecieron en un estado planctónico al igual que aquellas que expresaban Fos β (Figura 4B). La DO₆₀₀ de un cultivo de bacterias expresando tanto Jun β como HE β disminuyó tan solo a la mitad de la DO inicial, indicando que solo una parte del cultivo precipita, probablemente la correspondiente a las bacterias expresando Jun β . Mientras que una población de células expresando Fos β y Jun β co-sedimentó a los mismos niveles que los correspondientes al cultivo expresando Jun β . Ese dato confirmó que la precipitación del cultivo de bacterias expresando tanto Fos β como Jun β fue debido a las interacciones heterodiméricas de los dominios de las cremalleras de leucina de Fos y de Jun.

En la Figura 4C se muestran las imágenes de microscopía (contraste de fase), de los agregados formados por la población que expresa Fos β , Jun β , y por la población mixta de células que expresan Fos β y Jun β .

La información relativa a la identificación de las secuencias peptídicas descritas en la presente invención, que se acompaña a la presente memoria en formato legible por ordenador, es idéntica al listado de secuencias que se presenta acompañando a la memoria.

Ejemplo 6. Expresión de los plásmidos pCNBJun β y pCNBFos β tanto en *Pseudomonas putida* como en *E. coli* inducida por 3-metil benzoato.

Los plásmidos pFos β y pJun β se digirieron con NotI y los fragmentos de 1620 pb que contienen los genes de las proteínas híbridas Fos β y Jun β se clonaron en pCNB1 (de Lorenzo V. et al., Gene 1993, 123(1):17-24) digerido con NotI, dando lugar a los plásmidos pCNBFos β y pCNBJun β .

Así, la expresión de Fos β y Jun β quedó bajo el promotor *Pm*, un promotor regulable e inducible con 3-metil benzoato.

Estas construcciones se expresaron eficientemente en *E. coli*, estirpe CC118 λ pir.

El plásmido pCNB1 tiene un origen de replicación promiscuo, R6K, lo que permite su replicación en una gran variedad de bacterias Gram-negativas. Además posee un origen de transferencia (*oriT* RP4) lo que permite su conjugación. Además este plásmido contiene un cassette con la resistencia a Km, el activador XylS, el promotor *Pm* y las proteínas que se clonen bajo este promotor. En este caso fueron Fos β y Jun β . El plásmido también codifica para la transportasa que permite la inserción del cassette en el cromosoma de las bacterias receptoras.

Se conjugó el plásmido en *Pseudomonas putida* KT2440, donde se obtuvieron colonias Km^r y Pir^s. Estas colonias expresaban eficazmente las proteínas Fos β y Jun β desde el cromosoma de *P. putida*.

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión que se expresa sobre la superficie de la membrana externa de bacterias caracterizada porque comprende un dominio de dimerización como dominio pasajero y un dominio transportador de la familia de los autotransportadores.
2. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque comprende la cremallera de leucina del factor de transcripción eucariótico de Jun como dominio pasajero.
3. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende la cremallera de leucina del factor de transcripción eucariótico de Fos como dominio pasajero.
4. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicaciones 2 a 3, caracterizada porque comprende el dominio transportador de la IgA proteasa de *Neisseria gonorrhoeae*.
5. Proteína de fusión que se expresa sobre la superficie de la membrana externa de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende un péptido señal que la transporta al periplasma.
6. Proteína de fusión según la reivindicación 5, caracterizada porque el péptido señal es el de PelB.
7. Proteína de fusión que se expresa sobre la superficie de la membrana externa de bacterias, según las reivindicaciones 1-6, caracterizada porque comprende el epítipo E-tag que permite su inmunodetección.
8. Plásmido que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 5 o una secuencia de nucleótidos la cual tiene una identidad superior al 80% a dicha secuencia o fragmentos de la misma que codifiquen al menos para la proteína de fusión de la cremallera de leucina de Fos y el dominio beta de la IgA proteasa.
9. Plásmido que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 6 o una secuencia de nucleótidos la cual tiene

una identidad superior al 80% a dicha secuencia o fragmentos de la misma que codifiquen al menos para la proteína de fusión de la cremallera de leucina de Jun y el dominio beta de la IgA proteasa.

- 5 10. Plásmido según las reivindicaciones anteriores 8 y 9, caracterizado porque la expresión de la proteína de fusión está controlada por el promotor *lac* o el promotor *Pm*.
- 10 11. Cultivo de bacterias que contiene cualquiera de los plásmidos de las reivindicaciones 8 a 10.
12. Cultivo de bacterias según la reivindicación anterior en el que la bacteria es *E. coli*.
- 15 13. Método de agregación bacteriana dirigida caracterizado porque comprende la expresión, en la superficie de la membrana externa de éstas, de una proteína de fusión que comprende un dominio de dimerización como dominio pasajero y un dominio transportador de la familia de los autotransportadores.
- 20 14. Método según la reivindicación anterior 13, caracterizado porque comprende un cultivo de bacterias que expresan Jun β .
15. Método según la reivindicación anterior 14, caracterizado porque el cultivo de bacterias contiene el plásmido pJun β .
- 25 16. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque comprende un cultivo de una población mixta de bacterias que expresan Fos β y Jun β .
17. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque a un cultivo de bacterias que expresan Fos β se le adiciona otro cultivo distinto expresando Jun β .
- 30 18. Método según la reivindicaciones 16 y 17, caracterizado porque las bacterias contienen los plásmidos pFos β o pJun β .
19. Método de agregación bacteriana dirigida caracterizado porque dicha agregación se logra mediante la adición de un inductor que activa la expresión de los dominios Fos y/o Jun en la superficie de las bacterias.
- 35 20. Método según la reivindicación 19, caracterizado

porque el agente inductor es IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido).

21. Método según la reivindicación 19, caracterizado porque el agente inductor es 3-metil benzoato.
- 5 22. Uso de una proteína de fusión que comprende un dominio de dimerización como dominio pasajero y un dominio transportador de la familia de los autotransportadores, en la reprogramación de las propiedades de adhesión de bacterias.
- 10 23. Uso de una proteína de fusión según las reivindicaciones 2 a 7 en la recolección de bacterias procedentes de un cultivo en suspensión induciendo la agregación de dichas bacterias mediante la adición de un inductor que activa la expresión de los dominios
- 15 Fos y Jun en la superficie de las bacterias.
24. Uso según la reivindicación anterior 23, caracterizado porque la agregación se logra mediante la adición de IPTG.

Fig. 1

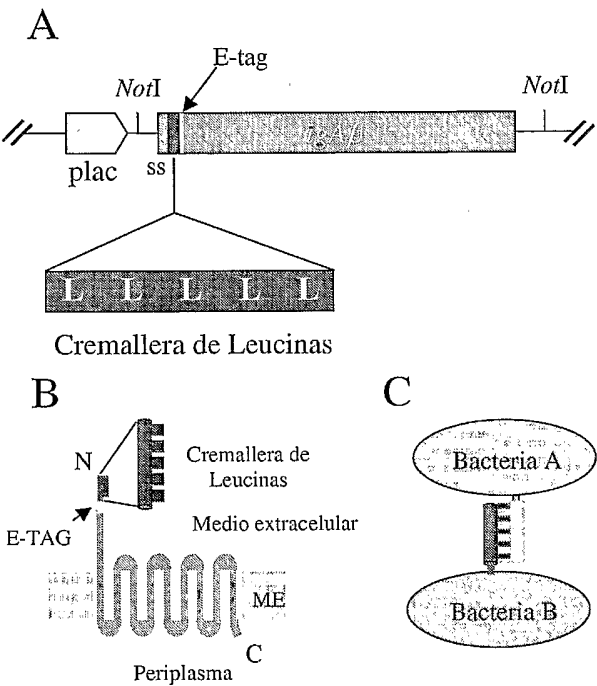


Fig. 2

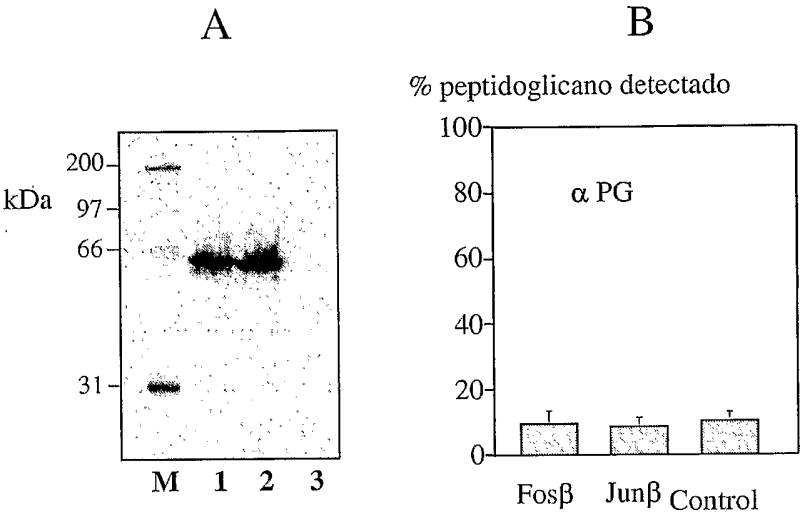


Fig. 3

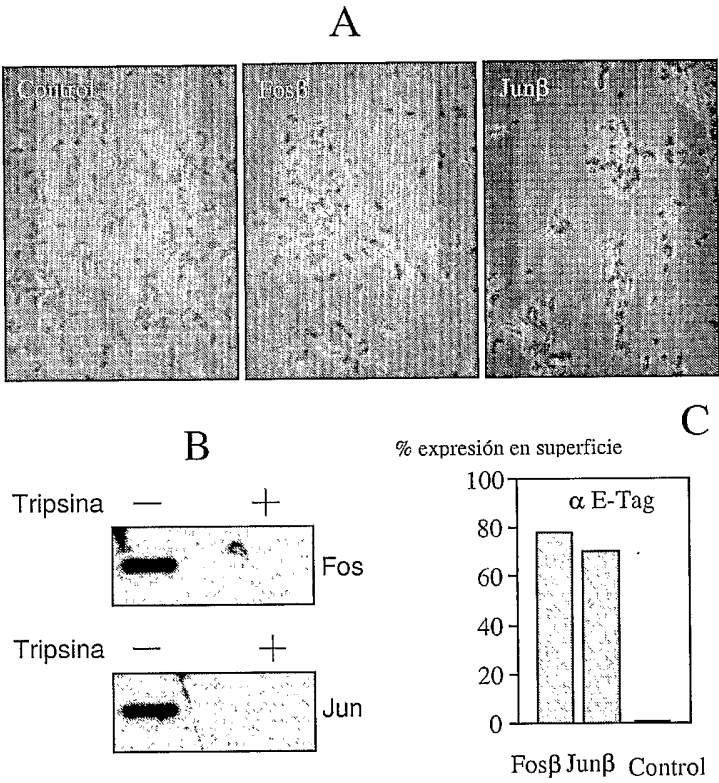


Fig.4

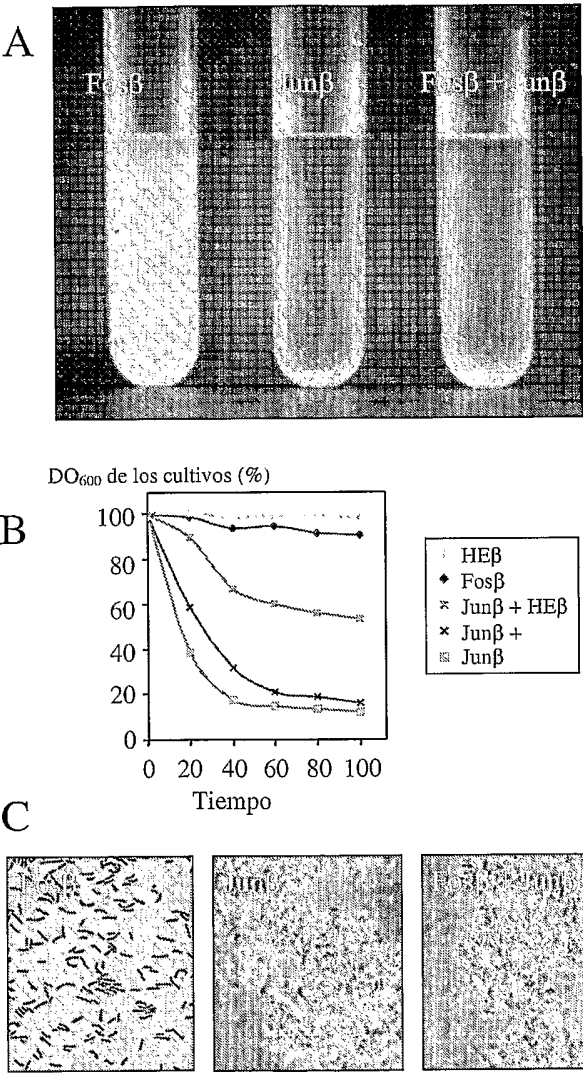
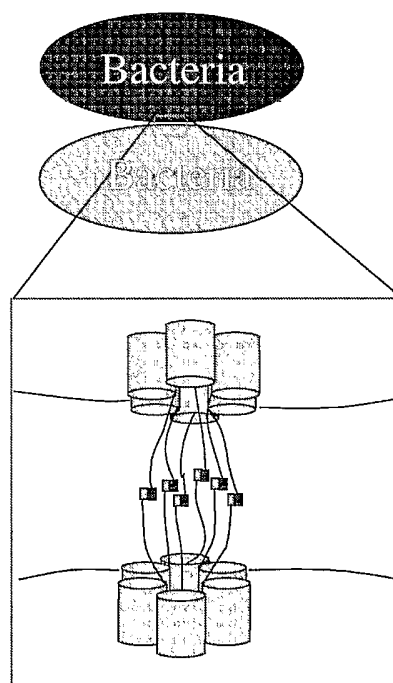


Fig. 5



1/9

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 5 <120> Agregación específica de bacterias mediante la expresión en
 superficie de proteínas de fusión
 <130> agregación bacteriana
 10 <140> 200301348
 <141> 2003-06-06
 <160> 6
 15 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 46
 <212> DNA
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido iniciador fos1
 25 <400> 1
 attactcgcg gccagccgg ccatggcgga cctgaccgac accctg 46
 <210> 2
 30 <211> 44
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido iniciador fos2
 <400> 2
 gctcgaattc ggccccgag gcctcgtgtg ccgccaggat gaac 44
 40 <210> 3
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido iniciador Jun1
 <400> 3
 50 attactcgcg gccagccgg ccatggcgga ccggatcgcc cggetc 46
 <210> 4
 <211> 46
 55 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido iniciador Jun2

2/9

<400> 4
gctcgaattc ggcccccgag gcctcgtggt tcatgacttt ctgttt 46

5 <210> 5
<211> 5362
<212> DNA
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del plásmido pFosbeta

15 <220>
<221> promoter
<222> (1269)..(1298)

20 <220>
<221> -35_signal
<222> (1269)..(1274)

25 <220>
<221> -10_signal
<222> (1293)..(1298)

30 <220>
<221> RBS
<222> (1332)..(1335)

35 <220>
<221> Proteína-de-fusión
<222> (1395)..(2942)

40 <220>
<221> peptido-señal-PelB
<222> (1395)..(1449)

45 <220>
<221> cremallera-de-leucina-de-fos
<222> (1450)..(1593)

50 <220>
<221> E-Tag
<222> (1594)..(1653)

55 <220>
<221> dominio-autotransportador-de-IgA-proteasa
<222> (1717)..(2942)

60 <220>
<221> CAT-gen-de-resistencia
<222> (3723)..(4380)

<220>
<221> ColE1-origin-cassette
<222> (4675)..(5358)

<400> 5
acccgacacc atcgaatggc gcaaaacctt tcgcggtatg gcatgatagc gcccggaaga 60

3/9

gagtcaattc aggggtggtga atgtgaaacc agtaacgtta tacgatgtcg cagagtatgc 120
 cgggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag gccagccacg tttctgcgaa 180
 5 aacgcgggaa aaagtggaaag cggcgatggc ggagctgaat tacattccca accgcgtggc 240
 acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct gattggcggt gccacctcca gtctggccct 300
 10 gcacgcgccc tgcgaaattg tcgcgcgat taaatctcgc gccgatcaac tgggtgccag 360
 cgtgggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc tgtaaagcgg cgggtgcacaa 420
 tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat ccgctggatg accaggatgc 480
 15 cattgctgtg gaagctgcct gcactaatgt tccggcggtta tttcttgatg tctctgacca 540
 gacacccatc aacagtatta ttttctccca tgaagacggt acgcgactgg gcgtggagca 600
 20 tctggtcgca ttgggtcacc agcaaactgc gctgttagcg ggccattaa gttctgtctc 660
 ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact cgcaatcaaa ttcagccgat 720
 agcggaacgg gaaggcgact ggagtgccat gtccggtttt caacaaacca tgcaaatgct 780
 25 gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac gatcagatgg cgctgggcgc 840
 aatgcgcgcc attaccgagt cggggctgcg cgttggtgcg gacatctcgg tagtgggata 900
 30 cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgcggtta accaccatca aacaggatgt 960
 tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa ctctctcagg gccaggcggg 1020
 gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga aaaaccaccc tggcgcccaa 1080
 35 tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacagg 1140
 ttcccagactg gaaagcgggc agtgagcggg acccgataaa agcggcttcc tgacaggagg 1200
 40 ccgttttgtt ttgcagccca cctcaacgca attaattgtg gttagctcac tcattaggca 1260
 ccccaggctt tacactttat gcttcgggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa 1320
 caatttcaca caggaaacag ctatgacat gattacgaat ttctaggcgg ccgcctagat 1380
 45 aacgagggca aatcatgaaa tacctattgc ctacggcagc cgctggattg ttattactcg 1440
 cggcccagcc ggccatggcg gacctgaccg acacctgca ggcggaaacc gaccagctgg 1500
 50 aagacgaaaa atccgcgctg caaacgaaa tcgcgaacct gctgaaagaa aaagaaaagc 1560
 tggagttcat octggcggca cacgaggcct cgggggcca attcgctgac ggtgcgccgg 1620
 tgccgtatcc ggatccgctg gaaccgatcg acaattcagc cgcaattagt atggcaaadc 1680
 55 cacgtccacc aacaccgagg gtcgctgcgg ccgtattttc attggatgat tatgatgcaa 1740
 aagacaatag tgaatcatca ataggtaatt tagctcgtgt aataacctaga atgggaaggg 1800
 60 agttaattaa tgattatgaa gaaatcccct tggaggagtt ggaagatgaa gcggaagaag 1860

4/9

aacgtcgcca agcaacgcaa ttccactcca aaagtcgtaa ccgtagagct atatcatcgg 1920
aaccatcatc tgatgaagat gcatctgaat cggtttccac atcagacaaa caccctcaag 1980
5 ataatacggga acttcatgaa aaagttgaga cggcggggtt acaaccaaga gccgcgcagc 2040
cgcgaaacca agccgccgcg caagccgatg cagtcagcac caatactaac tcggctttat 2100
ctgacgcaat ggcaagcacg caatctatct tgttggatac aggtgcttac ttaacacggc 2160
10 acattgcaca aaaatcacgc gctgatgccg aaaaaaacag tgtttggatg tcaaacaccg 2220
gttatggccg tgattatgct tccgcacaat atcgccggtt tagttcgaaa cgcacgcaaa 2280
15 cacaaatcgg cattgaccgc agcttgtccg aaaatatgca gataggcggga gtattgactt 2340
actctgacag tcagcatact tttgatcagg cgggcggcaa aaatactttt gtgcaagcca 2400
acctttatgg taagtattat ttaaattgatg cttgggtatgt ggccggcgat attgggtgcg 2460
20 gcagcttgag aagccgggta caaacgcagc aaaaagcaaa ctttaaccga acaagcatcc 2520
aaaccggcct tactttgggc aatacgctga aaatcaatca attcgagatt gtccctagt 2580
25 cgggtatccg ttacagccgc ctgtcatctg cagattacaa gttgggtgac gacagtgtta 2640
aagtaagttc tatggcagtg aaaacactaa cggccggact ggattttgct tatcgggtta 2700
aagtcggcaa ccttaccgta aaacccttgt tatctgcagc ttactttgcc aattatggca 2760
30 aaggcggcgt gaattgtggc ggtaaattcct tcgcctataa agcagataat caacagcaat 2820
attcagcagg cgtcgcgtta ctgtaccgta atgttacatt aaacgtaaat ggcagtatta 2880
35 caaaaggaaa acaattggaa aaacaaaaat ccggacaaat taaaatacag attcgtttct 2940
aaaataccaa attcatagca aaataaaatg ccgtctgaac tcaagctgcg gccgcagctt 3000
gacctgtgaa gtgaaaaatg gcgcacattg tgcgacattt tttttgtctg ccgtttaccg 3060
40 ctactgcgtc acggatcccc acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt 3120
ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgccgctc ctttcgcttt 3180
45 cttcccttcc tttctcgcca cgttcgcgg ctttccccgt caagctctaa atcggggcat 3240
ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac ttgattaggg 3300
tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga 3360
50 gtocacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca accctatctc 3420
ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga 3480
55 gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttcagg 3540
tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc 3600
60 aaatatgtat ccgctcatgt cgagacgttg ggtgagggtc caactttcac cataatgaaa 3660

5/9

taagatcact accgggcgta ttttttgagt tatcgagatt ttcaggagct aaggaagcta 3720
aaatggagaa aaaaatcact ggatatacca ccgttgatat atcccaatgg catcgtaaag 3780
5 aacatthttga ggcatttcag tcagttgctc aatgtaccta taaccagacc gttcagctgg 3840
atattacggc ctttttaaaag accgtaaaga aaaataagca caagttttat ccggccttta 3900
ttcacattct tgcccgcctg atgaatgctc atccggagtt ccgtatggca atgaaagacg 3960
10 gtgagctggg gatatgggat agtggtcacc cttgttacac cgttttccat gagcaaactg 4020
aaacgthttc atcgctctgg agtgaatacc acgacgattt ccggcagttt ctacacatat 4080
15 attcgcaaga tgtggcgtgt tacgggtgaaa acctggccta tttccctaaa gggthttattg 4140
agaatatgtt tttcgtctca gccaatccct ggggtgagttt caccagtttt gattthaaacg 4200
tggccaatat ggacaacttc ttcgcccccg ttttcacat gggcaaatat tatacgcaag 4260
20 gcgacaagggt gctgatgccg ctggcgattc aggttcatca tgccgtctgt gatggcttcc 4320
atgtcggcag aatgcttaat gaattacaac agtactgcga tgagtggcag ggcggggcgt 4380
25 aatthttttta aggcagttat tgggtgccct aaacgcctgg tgctacgcct gaataagtga 4440
taataagcgg atgaatggca gaaattcgaa agcaaattcg acccggtcgt cggthtcaggg 4500
cagggtcgtt aaatagccgc ttatgtctat tgctggthta ccgthttatt gactaccgga 4560
30 agcagtgtga ccgtgtgctt ctcaaattgc tgaggccagt ttgctcaggc tctccccgtg 4620
gaggtaataa ttgctcgaca tgaccaaatt cccttaacgt gagthtttcgt tccactgagc 4680
35 gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cththththt tgccgcgtaat 4740
ctgtgcttg caaacaataa aaccaccgt accagcgtg gththththt cggtatcaaga 4800
gctaccaact cthththccga aggtactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt 4860
40 cththctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata 4920
cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac 4980
45 cgggttgga tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg 5040
ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 5100
tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag 5160
50 cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctgggtatct 5220
ttatagtcct gtcgggttht gccacctctg acttgagcgt cgathththt gatgctcgtc 5280
55 agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc thththacgt tcttggcctt 5340
ttgctggcct thtgctcaca tg 5362

6/9

```

    <211> 5362
    <212> DNA
    <213> artificial

5  <220>
    <223> secuencia de ADN del plásmido pJunbeta

10  <220>
    <221> promoter
    <222> (1269)..(1298)

    <220>
    <221> -35_signal
15  <222> (1269)..(1274)

    <220>
    <221> -10_signal
    <222> (1293)..(1298)
20

    <220>
    <221> RBS
    <222> (1332)..(1335)

25  <220>
    <221> RBS
    <222> (1332)..(1335)

30  <220>
    <221> proteína-de-fusión
    <222> (1395)..(2942)

    <220>
    <221> Peptido-sen al-PelB
35  <222> (1395)..(1449)

    <220>
    <221> cremallera-de-leucina-de-Jun
    <222> (1450)..(1593)
40

    <220>
    <221> E-Tag
    <222> (1594)..(1653)

45  <220>
    <221> dominio-autotransportador-de-IgA-proteasa
    <222> (1717)..(2942)

    <220>
50  <221> CAT-gen-de-resistencia
    <222> (3723)..(4380)

    <220>
    <221> ColE1-origin-cassette
55  <222> (4675)..(5358)

    <400> 6
    acccgacacc atcgaatggc gcaaaacctt tcgcggtatg gcatgatagc gcccggaaga 60

60  gagtcaattc aggggtggtga atgtgaaacc agtaacgtta tacgatgtcg cagagtatgc 120

```

7/9

cggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag gccagccacg tttctgcgaa 180
5 aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat tacattccca accgcgtggc 240
acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct gattggcggt gccacctcca gtctggccct 300
gcacgcgccg tcgcaaattg tcggcgcat taaatctcgc gccgatcaac tgggtgccag 360
10 cgtgggtgtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc tgtaaagcgg cgtgcacaa 420
tcttctcgcg caacgcgtca gtgggtgat cattaactat ccgctggatg accaggatgc 480
cattgctgtg gaagctgcct gactaatgt tccggcggtta tttcttgatg tctctgacca 540
15 gacacccatc aacagtatta ttttctccca tgaagacggt acgcgactgg gcgtggagca 600
tctggctcga ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg ggccattaa gttctgtctc 660
20 ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact cgcaatcaaa ttcagccgat 720
agcggaacgg gaaggcgact ggagtgccat gtccggtttt caacaaacca tgcaaatgct 780
gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac gatcagatgg cgctgggcgc 840
25 aatgcgcgcc attaccgagt ccgggtcgc cgttggtgcg gacatctcgg tagtgggata 900
cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgcggtta accaccatca aacaggatgt 960
30 tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa ctctctcagg gccaggcgg 1020
gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga aaaaccaccc tggcgccaa 1080
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cagcacagg 1140
35 ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgg acccgataaa agcggcttcc tgacaggagg 1200
ccgttttggt ttgcagcca cctcaacgca attaattgtga gttagctcac tcattaggca 1260
40 ccccaggctt tacactttat gcttcggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa 1320
caatttcaca caggaaacag ctatgacct gattacgaat ttctaggcgg ccgcctagat 1380
aacgagggca aatcatgaaa tacctattgc ctacggcagc cgctggattg ttattactcg 1440
45 cggcccagcc ggccatggcg gaccgatcg cccggctcga ggaaaaagtg aaaaccttga 1500
aagcgcaaaa ctccgagctg gcgtccacgg ccaacatgct cagggaacag gtggcacagc 1560
50 ttaaacagaa agtcatgaac cagaggcct cgggggcca attcgtcgac ggtgcgccg 1620
tgccgtatcc ggatccgctg gaaccgatcg acaattcagc cgcaattagt atggcaaatc 1680
cacgtccacc aacaccgcgg gtcgtgcgg ccgtattttc attggatgat tatgatgcaa 1740
55 aagacaatag tgaatcatca ataggtaatt tagctcgtgt aataacctaga atgggaaggg 1800
agttaattaa tgattatgaa gaaatcccct tggaggagtt ggaagatgaa gcggaagaag 1860
60 aacgtcgcca agcaacgcaa ttccactcca aaagtogtaa ccgtagagct atatcatcgg 1920

8/9

aaccatcatc tgatgaagat gcatctgaat cggtttccac atcagacaaa caccctcaag 1980
5 ataatacggg acttcatgaa aaagttgaga cggcggggtt acaaccaaga gccgcgcagc 2040
cgcgaaccca agccgccgcg caagccgatg cagtcagcac caatactaac tcggctttat 2100
ctgacgcaat ggcaagcacg caatctatct tgttggtatc aggtgcttac ttaacacggc 2160
10 acattgcaca aaaatcacgc gctgatgccg aaaaaaacag tgtttggatg tcaaacaccg 2220
gttatggccg tgattatgct tccgcacaat atcgccggtt tagttcgaaa cgcacgcaaa 2280
caciaatcgg cattgaccgc agcttgtccg aaaatatgca gataggcgga gtattgactt 2340
15 actctgacag tcagcactat tttgatcagg cgggcggcaa aaatactttt gtgcaagcca 2400
acctttatgg taagtattat ttaaagtatg ctgtgtatgt ggccggcgat attggtgctg 2460
20 gcagcttgag aagccggtta caaacgcagc aaaaagcaaa ctttaaccga acaagcatcc 2520
aaaccggcct tactttgggc aatacgtga aaatcaatca attcgagatt gtccctagt 2580
cggttatccg ttacagccgc ctgtcatctg cagattacaa gttgggtgac gacagtgtta 2640
25 aagtaagttc tatggcagtg aaaacactaa cgcccgact ggattttgct tatcggttta 2700
aagtcggcaa ccttaccgta aaacccttgt tatctgcagc ttactttgcc aattatggca 2760
30 aaggcggcgt gaatgtgggc ggtaaatcct tcgcctataa agcagataat caacagcaat 2820
attcagcagg cgtgcgtta ctgtaccgta atgttacatt aaacgtaaat ggcagtatta 2880
caaaaggaaa acaattggaa aaacaaaaat ccggacaaat taaaatacag attcgtttct 2940
35 aaaataccaa attcatagca aaataaaatg ccgtctgaac tcaagctgog gccgcagctt 3000
gacctgtgaa gtgaaaaatg gcgcacattg tgcgacattt tttttgtctg ccgtttaccg 3060
40 ctactgcgtc acggatcccc acgcgccttg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt 3120
ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgtc ctttcgcttt 3180
cttcccttcc tttctcgcca cgttcgcggc ctttccccgt caagctctaa atcggggcat 3240
45 ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac ttgattaggg 3300
tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga 3360
50 gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca accctatctc 3420
ggctctattct tttgatttat aagggtttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga 3480
gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttcagg 3540
55 tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc 3600
aaatatgtat ccgtcatgt cgagacgttg ggtgaggttc caactttcac cataatgaaa 3660
60 taagatcact accgggcgta ttttttgagt tatcgagatt ttcaggagct aaggaagcta 3720

9/9

aaatggagaa aaaaatcact ggatatacca ccgttgatat atcccaatgg catcgtaaag 3780
5 aacattttga ggcatttcag tcagttgctc aatgtaccta taaccagacc gttcagctgg 3840
atattacggc ctttttaaag accgtaaaga aaaataagca caagttttat ccggccttta 3900
ttcacattct tgcccgcctg atgaatgctc atccggagtt ccgtatggca atgaaagacg 3960
10 gtgagctggg gatatgggat agtggtcacc cttgttacac cgttttccat gagcaaactg 4020
aaacgttttc atcgctctgg agtgaatacc acgacgattt ccggcagttt ctacacatat 4080
15 attcgcaaga tgtggcgtgt tacgggtgaaa acctggccta tttccctaaa gggttttattg 4140
agaatatgtt tttcgtctca gccaatccct gggtaggttt caccagtttt gatttaaacg 4200
tggccaatat ggacaacttc ttgcctcccg ttttcacat gggcaaatat tatacgcaag 4260
20 ggcacaaggt gctgatgccg ctggcgattc aggttcatca tgccgtctgt gatggcttcc 4320
atgtcggcag aatgcttaat gaattacaac agtactgcca tgagtggcag ggcggggcgt 4380
aattttttta aggagttat tgggtgccctt aaacgcctgg tgctacgcct gaataagtga 4440
25 taataagcgg atgaatggca gaaattcgaa agcaaattcg acccggtcgt cggttcaggg 4500
cagggtcgtt aaatagccgc ttatgtctat tgctggttta ccggtttatt gactaccgga 4560
30 agcagtgatga ccgtgtgctt ctcaaagtc tgaggccagt ttgctcaggc tctccccgtg 4620
gaggtaataa ttgctcgaca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc 4680
gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttcc tgccgctaag 4740
35 ctgctgcttg caaacaaaaa aaccacgcgt accagcgggtg gtttggttgc cggatcaaga 4800
gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaataactgt 4860
40 ccttctagt tagcgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata 4920
cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac 4980
cgggttggtg tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg 5040
45 ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 5100
tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag 5160
50 cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctgggtatct 5220
ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc 5280
agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt 5340
55 ttgctggcct tttgctcaca tg 5362

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/070039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C12N 9/52, 15/12, 15/57, C07K 14/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12N, C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VEIGA, E. et al. "Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains". THE EMBO JOURNAL. 2002. Vol. 21, n° 9, pages 2122-2131, whole document.	1-24
A	ABATE C. et al. "Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: Both Fos and Jun contact DNA directly". PROC. NATL. ACAD. SCI. February 1990. Vol. 87, pages 1032-1036, whole document.	1-24
PX	VEIGA, E. et al. "Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: surface properties of <i>Escherichia coli</i> cells displaying Jun/Fos dimerization domains". JOURNAL OF BACTERIOLOGY. September 2003, Vol. 185, n° 18, pages 5585-5590, whole document.	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 2004 (31.08.04)

Date of mailing of the international search report

17 September 2004 (17.09.04)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/070039

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N 9/52, 15/12, 15/57, C07K 14/82

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12N, C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE, EMBL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	VEIGA, E. et al. "Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains". THE EMBO JOURNAL. 2002. Vol. 21, nº 9, páginas 2122-2131, todo el documento.	1-24
A	ABATE C. et al. "Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: Both Fos and Jun contact DNA directly". PROC. NATL. ACAD. SCI. Febrero 1990. Vol. 87, páginas 1032-1036, todo el documento.	1-24
PX	VEIGA, E. et al. "Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: surface properties of <i>Escherichia coli</i> cells displaying Jun/Fos dimerization domains". JOURNAL OF BACTERIOLOGY. Septiembre 2003, Vol. 185, nº 18, páginas 5585-5590, todo el documento.	1-24

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

31 Agosto 2004 (31.08.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

17 SEP 2004 17.09.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono + 34 91 3495552

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/070039

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (Continuación del punto 1.b de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las **secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:
 - a) Tipo de material
 - ☒ una lista de secuencias
 - ☐ Tabla(s) relativas a la lista de secuencias
 - b) Formato del material
 - ☐ por escrito
 - ☒ en soporte legible por ordenador
 - c) Fecha de presentación/entrega
 - ☐ contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
 - ☒ presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador
 - ☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales: