

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 801**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06000111 .2**
96 Fecha de presentación: **23.11.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1666058**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Método para diagnosticar una infección por pseudomonas aeruginosa**

30 Prioridad:
25.11.1998 US 109952 P
30.03.1999 US 126794 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2012

73 Titular/es:
MCW Research Foundation, Incorporated
8701 Watertown Plank Road Milwaukee
Wisconsin 53226, US y
The Regents of The University of California

72 Inventor/es:
Frank, Dara W.;
Sawa, Teiji;
Yahr, Timothy L. y
Wiener-Kronish, Jeanine

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 379 801 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar una infección por *Pseudomonas aeruginosa*

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno bacteriano oportunista capaz de causar infecciones pulmonares agudas fatales en individuos gravemente enfermos (1). La capacidad de las bacterias para dañar el epitelio pulmonar ha sido vinculada a la expresión de toxinas que son inyectadas directamente en las células eucariotas a través de un mecanismo de secreción y translocación mediado de tipo III (2,3).

10 Las proteínas codificadas por el aparato de secreción-translocación de tipo III de la *P.aeruginosa* demuestran un alto nivel de identidad de aminoácidos con miembros del regulón Yop de *la Yersinia* (4-6). De entre todos los sistemas de tipo III descubiertos en bacterias Gram-negativas, sólo *P. aeruginosa* posee un homólogo del antígeno *Yersinia V*, PcrV (véase 6 para revisar los sistemas tipo III). Las proteínas homólogas del aparato secreción y translocación están codificadas por bacterias patógenas tanto animales como vegetales. Estos organismos incluyen patógenos humanos como *Salmonella Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *E. Coli* enteropatógena, *Chlamydia spp.*, y patógenos vegetales como *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* and *Ralstonia solanacearum*.
15 No obstante, sólo *P. aeruginosa* y *Yersinia* codifican el antígeno V.

Yarh, et.al., 1997, describen la secuencia del operón que codifica PcrV y comparan la secuencia con la proteína LcrV. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de PcrV es conocida y está disponible con el número de acceso AF010149 de GenBank.

20 Anderson et al., (Infection and Immunity, 1996, p4580-4585) describen que el antígeno recombinante V procedente de *Yersinia pestis* protege a ratones contra la peste bubónica y neumónica causadas por cepas de *Yersinia pestis*.

En el documento US 5.599.665 se describen los ácidos nucleicos de *Pseudomonas aeruginosa* que codifican la actividad de la Exoenzima S y su uso en la detección de infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

COMPENDIO DE LA INVENCION

25 Esta invención proporciona un método para el diagnóstico de infección por *Pseudomonas aeruginosa* que comprende la etapa de exponer una muestra del paciente a una sonda de nucleótidos, en la que la sonda se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica PcrV y no con otros ácidos nucleicos.

La invención también proporciona un método para diagnosticar infección por *Pseudomonas aeruginosa* que comprende las etapas de

- 30 (a) exponer una muestra del paciente a cebadores de nucleótidos diseñados para amplificar el gen pcrV,
(b) llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en que el gen pcrV se amplifica si está presente en la muestra, y
(c) correlacionar infección por *Pseudomonas aeruginosa* con la presencia de un producto amplificado.

La invención proporciona adicionalmente un método para el diagnóstico de una infección por *Pseudomonas aeruginosa* que comprende las etapas de:

- 35 (a) exponer la muestra del paciente al antígeno PcrV, y
(b) correlacionar infección por *Pseudomonas aeruginosa* con la presencia de un complejo antígeno/anticuerpo específico de PcrV.

Por lo tanto, en una realización el ADN que codifica PcrV (denominado pcrV) o un fragmento de ADN se puede utilizar diagnósticamente para detectar infección por *P. aeruginosa*.

40 En otra realización, la proteína recombinante (rPcrV) se utiliza diagnósticamente para detectar anticuerpos de los pacientes. La respuesta de los anticuerpos del paciente a PcrV puede asociarse a un pronóstico. De esta forma, en esta realización la proteína recombinante se utiliza como indicador pronóstico mediante la medida del título de anticuerpos del paciente.

Es, por tanto, un objeto de esta invención detectar diagnósticamente infección por *P. aeruginosa*.

45 Otro objeto de la presente invención es detectar anticuerpos en pacientes con *Pseudomonas*.

Otros objetos, características y ventajas de esta invención resultarán evidentes para un experto en la técnica tras la revisión de la descripción, las reivindicaciones y los dibujos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figs. 1A y 1B son un gel teñido (Fig. 1A) y una transferencia Western (Fig. 1B) que ilustran el análisis fenotípico de PA103ΔpcrV.

5 Las Figs. 2A y 2B son un gráfico (Fig. 2A) y una serie de gráficos de barras (Fig. 2B) que ilustran la supervivencia y el daño pulmonar de cepas parentales y mutantes de *P. aeruginosa*.

Las Figs. 3A y 3B son un gráfico (Fig. 3A) y una serie de gráficos de barras (Fig. 3B) que ilustran el efecto de la inmunización en la supervivencia, el daño pulmonar y la colonización bacteriana.

10 La Fig. 4 es un gráfico del número de animales que sobreviven a un prueba de ataque con 5×10^5 UFC/ ratón de la cepa PA103 tras la administración pasiva de IgG policlonal específica para PcrV, ExoU, PopD o IgC control procedente de un animal no inmunizado.

La Fig. 5 es un gráfico (Fig. 5A) y una serie de gráficos de barras (Fig. 5B) que ilustran la supervivencia y protección frente al daño pulmonar por la administración concomitante de IgG frente a diferentes antígenos y pruebas de ataque bacterianas. ANOVA unidireccional para daño pulmonar, $p=0,026$, y edema pulmonar, $p < 0,0005$.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 En la presente memoria se describe que PcrV tiene un efecto regulador novedoso sobre la expresión de productos secretados de tipo III, está involucrada en la translocación de toxinas de tipo III, y es el primer antígeno que protege del daño pulmonar provocado por infección por *P. aeruginosa*. La vacunación contra PcrV previa a la instilación por vía aérea de IgG anti-PcrV no sólo aseguró la supervivencia de animales sometidos a la prueba de ataque sino que también redujo la inflamación pulmonar y el daño causado por la bacteria.

20 El LcrV, o el antígeno V, es una proteína multifuncional que regula la secreción/translocación de proteínas efectoras de Yop y tiene un papel extracelular en la patogénesis alterando la respuesta de las citoquinas del huésped a la infección por *Yersinia* (7-11). El único homólogo conocido de este factor patogénico crítico es una proteína extracelular codificada por *P. aeruginosa*, denominada PcrV.

25 Un método de moderar o inhibir la infección por *Pseudomonas aeruginosa* que comprende inmunizar un paciente con una cantidad efectiva del antígeno PcrV. Por "cantidad efectiva" se entiende una cantidad de antígeno PcrV eficaz para mostrar alguna moderación o inhibición de la infección por *Pseudomonas* por comparación con sujetos o animales control que no han sido tratados con el antígeno.

30 Por "moderar" se entiende que la infección se inhibe en al menos un cincuenta por ciento si se compara con un animal no inmunizado. Preferiblemente, la infección se previene completamente. Una estimación cuantitativa de la infección incluiría preferiblemente la determinación de la cantidad de bacterias en la corriente sanguínea o en los fluidos pleurales y/o la determinación de los parámetros de daño pulmonar. Por ejemplo, la ausencia de bacterias en la corriente sanguínea o en los fluidos pleurales indicará que se ha evitado la infección. Una reducción en parámetros de daño pulmonar indicará que la infección se ha moderado.

35 La infección podría estimarse cuantitativamente con otros indicadores clínicos, incluyendo la reducción de carga bacteriana en el esputo, la sangre o fluidos pleurales, la reducción de tamaño del infiltrado, la mejora en la oxigenación, la reducción del tiempo en ventilación mecánica, reducción de la fiebre y reducción en el recuento de glóbulos blancos.

40 Por "antígeno PcrV" se entiende la porción o fragmento de la proteína PcrV necesaria para incitar una respuesta inmune que previene o modera la infección. En este momento, se ha utilizado la proteína PcrV completa para inducir la protección. No obstante, un experto en la técnica puede trazar el mapa del epítipo protector en la molécula. Por ejemplo, la solicitante producirá anticuerpos monoclonales y los analizará para encontrar los anticuerpos que evitan la citotoxicidad en cultivos tisulares. Los anticuerpos que impiden la citotoxicidad serán examinados en los modelos de infección pulmonar aguda para la protección pasiva contra la infección. Los anticuerpos monoclonales generalmente reconocen una pequeña región del aminoácido y cuando los aminoácidos son contiguos, el epítipo puede quedar definido con tan sólo 6-9 aminoácidos. Para definir el epítipo, los anticuerpos monoclonales se ensayarán para determinar la unión a cadenas cada vez más pequeñas de PcrV recombinante. (Por "PcrV recombinante" o "rPcrV" se entiende la proteína producida a partir de un gen pcrV que ha sido introducido en un huésped no nativo). Esto debería localizar la región. En este punto, se sintetizarán químicamente tramos de aminoácidos que definen el epítipo. Estos epítipos sintetizados químicamente pueden ligarse a moléculas portadoras y utilizarse en la
 45 inmunización para determinar si se ha conseguido protección. Alternativamente, se pueden construir diferentes clones de PcrV, producir y purificar proteínas recombinantes, y ensayar estos antígenos en experimentos de
 50 inmunización y pruebas de ataque.

Basándose en estudios de obtención de mapas desarrollados con PcrV, se predice que el epítipo se encuentra entre los aminoácidos 113 y 245.

- El antígeno PcrV puede obtenerse más fácilmente por el método usado por la solicitante, un plásmido de expresión bacteriana disponible en el mercado denominado pet16b de Novagen. El gen pcrV fue clonado primero a partir de un cromosoma de *P. aeruginosa* como parte de un operón. La región codificante fue amplificada e insertada en dos vectores diferentes. Un vector es para la expresión de *P. aeruginosa* como se muestra en la Fig. 1. Este es un vector procedente de Herber Schweizer (referencia 19) que modificamos para contener una secuencia de promotor adecuada de forma que la expresión de PcrV se regule coordinadamente con el resto de los aparatos de suministro e intoxicación de la bacteria. El segundo plásmido, pET16b, tiene como propósito la expresión y purificación en *E.Coli*.
- La ventaja de este sistema es que no hay que preocuparse por proteínas de *P. aeruginosa* contaminantes, la proteína se produce abundantemente, y tiene lugar un proceso de purificación de un solo paso. En esta situación, la región codificante de PcrV se amplifica para clonarse en el mismo marco de una cola de histidina proporcionada por el vector pET16b. Los restos múltiples de histidina fusionados al extremo amino-terminal de PcrV permiten la cromatografía de afinidad utilizando una columna níquel-ANT. Por lo tanto, un antígeno preferible es una versión recombinante de la proteína PcrV natural.
- En otra realización, se administran anticuerpos para PcrV monoclonales o policlonales humanos o humanizados para prevenir o tratar la infección por *P. aeruginosa*. En pacientes con alto riesgo de infección por *P. aeruginosa*, podrían suministrarse anticuerpos para la prevención de la infección. Adicionalmente, los anticuerpos pueden administrarse tras el inicio de la infección para su tratamiento. En este caso, los anticuerpos pueden administrarse a solas o en combinación con antibióticos. La administración conjunta de anticuerpos y antibióticos puede permitir la administración de cursos más cortos o dosis menores de antibióticos, reduciendo de esta forma el riesgo de aparición de organismos resistentes a antibióticos.
- Se consideran al menos tres tipos de pacientes hipotéticos: (1) Un individuo sano con riesgo de herida o quemadura grave (bombero, personal militar, policía) sería inmunizado con la vacuna utilizando una metodología (bien por inyección o intranasal) que proporcionará protección de larga duración. Se administraría un recuerdo (inyección intramuscular) en el hospital tras la lesión. (2) Un paciente sometido a ventilación mecánica. (3) Un paciente al que se le ha diagnosticado genéticamente de fibrosis quística.
- La inmunización puede realizarse por vía sistémica o intranasal. La inmunización de los individuos empezaría preferiblemente durante los procedimientos de vacunación normal para otras enfermedades infantiles. Predecimos una protección de larga duración con dosis de recuerdo en edades comprendidas probablemente entre los 5 y 10 años.
- De acuerdo con la invención, podría usarse el ADN que codifica la proteína PcrV o el complemento de este ADN para detectar diagnósticamente infección por *P. aeruginosa*. La secuencia de ADN del antígeno PcrV podría obtenerse de GenBank AF010149. La región codificante de PcrV está entre los nucleótidos 626-1510. Podría seleccionarse para su uso un fragmento de esta región codificante o un complemento de este fragmento. Una sonda eficaz es aquella que hibride específicamente con el ADN de PcrV y no con otras regiones.
- Preferiblemente se utilizará una sonda de hibridación con al menos 40 nucleótidos continuos dentro de la secuencia del antígeno o dos cebadores de al menos 25 nucleótidos continuos dentro de la secuencia. Un experto en la materia se dará cuenta de que muchos métodos estándar de técnicas de diagnóstico de ácidos nucleicos serían apropiados, por ejemplo, hibridación de sondas de cadena simple de 40 nucleótidos de ADN o ARN extraído del esputo de un paciente. En otro ejemplo, el esputo del paciente se utilizará como fuente de ADN o ARN bacteriano para servir como molde para la reacción PCR o RT PCR, respectivamente.
- Se determinará también la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en un individuo poniendo en contacto una muestra del individuo con un anticuerpo específico para PcrV y correlacionando la unión del anticuerpo mejorado comparándola con una muestra control de la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en el individuo.
- La proteína o el antígeno podrán utilizarse también en el diagnóstico para detectar anticuerpos en pacientes y así, predecir el estado de infección del paciente. Preferiblemente se pondrá en contacto una muestra obtenida de un individuo sospechoso de infección por *Pseudomonas* con la proteína PcrV o un fragmento de la misma y se detectará la unión proteína/anticuerpo. Después se correlacionará la unión mejorada del anticuerpo (comparada con la muestra control) con la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en el individuo.
- Se sabe que las especies de *Pseudomonas* infectan un amplio espectro de hospedantes dentro del reino animal e incluso dentro del reino vegetal. Como será evidente para un experto medio en la técnica, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria pueden tener uso en una amplia variedad de organismos para inhibir o modular enfermedades o estados derivados de infección por especies de *Pseudomonas*. Las composiciones y métodos de la presente invención se describen en la presente memoria particularmente para la aplicación a *Pseudomonas aeruginosa*, pero se encuentra dentro de las competencias de un experto medio en la técnica aplicar los métodos que se muestran en la presente a otras especies.

Ejemplos

1) Papel de PcrV en la citotoxicidad

Para determinar el papel de PcrV en la regulación/secreción mediada de tipo III, construimos un alelo apolar de PcrV y utilizamos la construcción para remplazar un alelo salvaje en una cepa de *P. aeruginosa* PA103, una cepa que es altamente citotóxica in vitro (3) y que causa daño epitelial pulmonar in vivo (12,13). La citotoxicidad y el daño pulmonar se deben a la producción de una citotoxina específica, ExoU (3).

Se caracterizó PA103ΔpcrV por la expresión de varios productos extracelulares secretados por el sistema de tipo III de la *P. aeruginosa* que incluye la citotoxina ExoU (3), PcrV (5) y una proteína requerida para la translocación de toxinas, PopD (14). La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de sobrenadantes concentrados de los cultivos indicó que la cepa parental, PA103, se induce para la producción y secreción de proteínas de tipo III por crecimiento en un medio que contiene un quelante del calcio, ácido nitrilotriacético (ANT) (Fig.1). Cuando un clon de expresión que codifica PcrV se proporciona en posición trans en la cepa parental, la producción extracelular de proteína es normal tanto en presencia como en ausencia de ANT. PA103ΔpcrV presenta un fenotipo ciego al calcio; la producción extracelular de proteína se induce fuertemente tanto en presencia como en ausencia de ANT. Estos resultados sugieren que el sistema de secreción es completamente funcional pero está desregulado. Este fenotipo desregulado contrasta con el fenotipo independiente del calcio dado a conocer para una cepa defectuosa en LcrV incapaz de producir Yops extracelular, crece a 37°C independientemente de la presencia o ausencia de calcio, y muestra sólo una inducción parcial de Yops (7). Al complementar PA103ΔpcrV con un clon que expresa PcrV salvaje se restableció la regulación normal de la producción de proteína en respuesta a la inducción con ANT.

Para ensayar la contribución de PcrV a la patogénesis de la *P. aeruginosa*, se utilizaron dos modelos de infección. En un modelo in vitro se comparó la capacidad de la cepa parental y varias cepas mutantes derivadas para causar citotoxicidad en un ensayo de infección con células CHO (3). Los controles negativos en este experimento incluyeron PA103popD::Ω, que había demostrado previamente ser defectuoso en la translocación de los determinantes de la virulencia de tipo III (14) y PA103ΔexoU, que es no citotóxico debido a la ausencia de producción de ExoU (3,15).

Tras una infección de 3 horas, las células CHO con cepas salvajes y cepas ΔpcrV complementadas con una construcción plasmídica que expresaba PcrV fueron incapaces de excluir el azul de tripano. La tinción no tuvo lugar cuando las células CHO se infectaron con las cepas de control negativas o con PA103pcrV (no se muestran los datos). Estos resultados sugieren que se requiere la expresión de PcrV para que se produzca citotoxicidad. La PcrV recombinante purificada no fue citotóxica cuando se añadió de forma exógena a células de cultivos tisulares. Puesto que la secreción de proteínas de tipo III requerida para la translocación no se vio afectada por la supresión de pcrV (Fig. 1A y 1B), la proteína PA103ΔpcrV resulta defectuosa para la translocación de ExoU.

Las Figs. 1A y 1B son un gel teñido (Fig. 1A) y una transferencia Western (Fig. 1B) que ilustran el análisis fenotípico de PA103ΔpcrV. La cepa parental y los derivados ΔpcrV, con o sin plásmido que exprese PcrV en trans, se hicieron crecer en ausencia o presencia de un inductor de secreción de tipo III en *P. aeruginosa*, ácido nitrilotriacético (ANT). El perfil de las proteínas extracelulares (Fig. 1A) se analizó en un gel de poliacrilamida (10%) con SDS teñido con azul de Coomassie. La migración de proteínas de tipo III codificadas por *P. aeruginosa* se indica a la izquierda y la migración de los marcadores de masa molecular se indica a la derecha. La Fig. 1B es una transferencia Western de un gel duplicado empleando anticuerpos específicos para ExoU, PcrV, y PopD y proteína A-I¹²⁵ para detectar IgG unida.

Las cepas salvajes y mutantes de *P. aeruginosa* se ensayaron en modelos de infección pulmonar aguda utilizando dosis de ataque bajas y altas de bacterias. Las medidas de supervivencia indicaron que se necesitaba PcrV y PopD para inducir una infección letal (Fig. 2A). En los experimentos que utilizaban tres medidas independientes de daño pulmonar (el flujo de albúmina marcada desde los espacios aéreos de los pulmones a la corriente sanguínea, el flujo de albúmina marcada desde los espacios aéreos de los pulmones a los fluidos pleurales, y la proporción húmedo/seco, que mide edema pulmonar), el grado de daño causado por PA103 pcrV, la cepa control vector (PA103ΔpcrVpUCP18), y PA103popD::Ω no eran distintos de los de los animales control no infectados (Fig. 2B). La complementación de PA103ΔpcrV con pcrV en trans restableció los niveles de daño pulmonar a los medidos con la cepa parental, PA103. Estos datos, considerados en conjunto, indican que se requiere la expresión de PcrV para que se produzca virulencia en la modelos de infección pulmonar aguda por *P. aeruginosa* y que parte de la función de PcrV está ligada a la habilidad para translocar proteínas efectoras de tipo III hacia el interior de células eucariotas.

Las Figs. 2A y 2B son un gráfico (2A) y una serie de gráficos de barras (Fig. 2B) que ilustran la supervivencia y el daño pulmonar de cepas parentales y mutantes de *P. aeruginosa*. Con respecto a la Fig. 2A, se sometió a los ratones a una prueba de ataque con 5×10^5 UFC de cada una de las cepas indicadas y se monitorizó la supervivencia durante una semana. Con respecto a la Fig. 2B, el daño pulmonar fue evaluado mediante el flujo de albúmina marcada desde los espacios aéreos del pulmón a la sangre (daño epitelial pulmonar), al fluido pleural (fluido pleural) o midiendo la proporción húmedo/seco (edema pulmonar). Se utilizaron dos dosis de bacterias infecciosas como indican las barras rellenas y con rayas. Mediante ensayos ANOVA unidireccionales de comparación múltiple de Dunnett se determinaron diferencias significativas (* $p < 0,001$) entre los grupos de control y

ensayo. Se utilizaron las siguientes abreviaturas: PA103, cepa salvaje parental; Δ pcrV, PA103 Δ pcrV; Δ pcrVpUCP, PA103pcrV completada con un plásmido que expresa pCRV; Δ pcrVpUCP, PA103 Δ pcrV con un vector control; popD:: Ω , PA103popD:: Ω , una cepa deficiente en la translocación.

2) Inmunización con PcrV

5 Para determinar si la inmunización con PcrV protegía a los animales de una infección pulmonar letal, se purificaron PcrV recombinante (rPcrV) o ExoU recombinante (rExoU) como proteínas de fusión de una cola de histidinas, y se utilizaron como antígenos. Los ratones quedaron inmunizados y posteriormente se sometieron a una prueba de ataque en sus espacios aéreos con una dosis letal de la cepa PA103. Cuando se determinó la supervivencia, ambas vacunas protegían a los ratones (Fig. 3A). Cuando se evaluó el daño pulmonar, sólo los animales vacunados con PcrV tenían daño epitelial y edema pulmonar significativamente menores (Fig. 3B). Los animales inmunizados con la vacuna PcrV tenían también menor número de bacterias en sus pulmones, lo que sugiere que un bloqueo del antígeno V de la *Pseudomonas* puede facilitar la limpieza rápida de las bacterias de los pulmones, protegiendo a los animales de un daño epitelial pulmonar grave (Fig. 3B).

15 Las Fig. 3A y 3B son un gráfico (Fig. 3A) y una serie de gráficos de barras (Fig. 3B) que ilustran el efecto de la inmunización en la supervivencia, el daño pulmonar y la colonización bacteriana. En relación con la Fig. 3A, los ratones fueron inmunizados (PcrV, n=10; ExoU, n=5; control, n=10) como se ha indicado anteriormente y se sometieron a una prueba de ataque con una cepa PA103 a razón de 5×10^5 UFC/animal. El porcentaje de animales supervivientes se evaluó durante una semana; $p < 0,05$ utilizando la prueba de rango logarítmico de Mantel Cox. En relación a la Fig. 3B, representa la evaluación del daño pulmonar y de la colonización bacteriana de los animales 4 horas después de la instilación de PA103. Daño epitelial pulmonar, edema pulmonar, y carga bacteriana; PcrV, n=9; ExoU; n=4; y control, n=8. El recuento final de bacterias en el pulmón se indica como el número del eje Y $\times 10^4$ UFC. Las diferencias significativas (*) para daño pulmonar ($p < 0,01$), edema pulmonar ($p < 0,05$), y en el recuento bacteriano ($p < 0,05$) como las determinadas por la prueba de comparación múltiple de Dunnett. ANOVA unidireccional para daño pulmonar, $p=0,0005$; edema pulmonar, $p=0,0437$; carga bacteriana, $p=0,0075$.

25 Para determinar si una intervención terapéutica era posible, los ratones fueron inmunizados pasivamente con IgG de conejo preinmune o IgG de conejo específica para rPcrV, rExoU, o rPopD una hora antes de la instilación por vía aérea de PA103 en concentraciones de 5×10^5 UFC/ ratón. Los anticuerpos para rPcrV proporcionaron inmunización completa frente de la infección letal (Fig. 4). La IgG anti-r ExoU proporcionó una supervivencia parcial, significativamente diferente a la procedente de la administración de IgG control, aunque todos los animales supervivientes cayeron gravemente enfermos durante la prueba. La supervivencia no mejoró por la transferencia pasiva de anticuerpos específicos de otras proteínas de translocación de tipo III, PopD. De estos resultados se concluye que los anticuerpos para PcrV son altamente protectores en el modelo de infección pulmonar aguda y que PcrV puede exponerse a la pared bacteriana o en forma soluble disponible para las interacciones antígeno-anticuerpo.

35 La Fig. 4 es un gráfico con el número de animales que sobreviven a una prueba de ataque con 5×10^5 UFC/ ratón de la cepa PA103. Los animales fueron pretratados con 100 μ g de IgG inmune e IgG control de un conejo no inmunizado (rPcrV, suero preinmune rPcrV); N=10 para cada grupo; * $p < 0,05$ frente a un grupo de control para el tratamiento con preparaciones de IgG anti-PcrV y anti-ExoU, mediante la prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox.

40 Si PcrV está accesible para su neutralización, la administración concomitante del inóculo bacteriano con IgG anti-rPcrV deberá proteger completamente frente al daño pulmonar y la mortalidad. Las preparaciones de IgG se mezclaron con el inóculo (una dosis 10 veces superior al inóculo letal) antes de la instilación de las bacterias en el pulmón, y se midió la supervivencia. Solo IgG anti-rPcrV protegió frente a esta infección extrema (Fig. 5A). El daño pulmonar se midió en animales infectados con la dosis letal normal de 5×10^5 bacterias. El flujo de salida de la albúmina marcada de los espacios aéreos del pulmón fue solo un 3% mayor que en el control no infectado (Fig.5B) tras la coadministración de IgG anti-rPcrV. La reducción del flujo de salida de la proteína marcada desde el pulmón a los fluidos pleurales fue igual que en control no infectado cuando se incluyó anti-PcrV en el inóculo. Curiosamente, el edema pulmonar, medido como proporción húmedo/seco, se redujo significativamente con la adición tanto de anti-rPcrV como de anti-rPopD. (Fig. 5B). Por lo tanto, la administración concomitante de anti IgG rPcrV con bacterias fue aún más eficaz que la vacunación para normalizar todos los parámetros de daño pulmonar. Estos datos respaldan la accesibilidad de PcrV para la neutralización mediada por anticuerpos y documentan un descenso clínico relevante del daño pulmonar; los anticuerpos para PcrV pueden servir como agentes terapéuticos en el tratamiento de neumonía nosocomial grave causada por *Pseudomonas aeruginosa*.

55 La figura 5 es un gráfico (Fig. 5A) y una serie de gráficos de barras (Fig. 5B), que ilustran la supervivencia y protección frente al daño pulmonar en la administración concomitante de IgG y una prueba de ataque bacteriano. Se mezcló IgG (5 μ g) con bien 5×10^6 (para los ensayos de supervivencia, n=10 por grupo), o con 5×10^6 (para la medida del daño pulmonar, n=4-6 animales por grupo) de la cepa PA103 de *P. aeruginosa*. Esta mezcla se instiló en los pulmones y se evaluó la supervivencia (Fig. 5A) o la lesión pulmonar (Fig. 5B). Para la supervivencia * $p < 0,05$ frente a la IgG control para anti-PcrV, mediante la prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox; para el daño epitelial

pulmonar y edema pulmonar * $p < 0,05$ frente a IgG control, por la prueba de comparación múltiple de Dunnett. ANOVA unidireccional para la lesión pulmonar, $p = 0,026$, y edema pulmonar, $p < 0,0005$.

5 En infecciones agudas por *P. aeruginosa*, el efecto neto de la intoxicación mediada de tipo III puede ser el propiciar la diseminación de la bacteria más allá del epitelio llevando a la infección de los fluidos pleurales, el bazo, el hígado y la corriente sanguínea. Las infecciones de transmisión sanguínea por *P. aeruginosa* ya sea por neumonía asociada a ventilación aguda o por infecciones debidas a heridas por quemaduras, pueden llevar a una tasa de mortalidad de 40-80%, incluso con tratamiento agresivo con antibióticos (16). PcrV debe ser un componente del complejo de translocación mediada de tipo III, ya que los mutantes deficientes en producción de esta proteínas son incapaces de intoxicar células CHO o cuasar daño pulmonar epitelial, a pesar de que son capaces de de segregar 10 efectores tipo III y las proteínas necesarias en la translocación. A diferencia de PopD, que también es necesaria en la translocación, PcrV está accesible para la neutralización mediada por anticuerpos, lo que sugiere que los anticuerpos pueden ser agentes terapéuticos útiles en infecciones agudas.

3) Métodos para los ejemplos 1 y 2

Construcción y complementación de una inserción apolar en pcrV.

15 Un fragmento de restricción *EcoRI-Nsil* de 5.0-kb que codifica *pcrGVHpopBD* y sus secuencias de acompañamiento fue clonado en el vector de reemplazamiento alélico pNOT19 (17). Dos sitios *NotI* (uno dentro de *pcrG* y uno dentro de *popB*) fueron reemplazados de la secuencia insertada utilizando el sistema de mutagénesis Sculptor (Amersham). Se eliminó un fragmento de restricción *SstI* interno de *pcrV*, dando lugar a una supresión dentro del marco de lectura de los restos 17-221 (pNOT Δ *pcrV*). Para seleccionar de cara a la integración en el plásmido, un gen que codifica la resistencia a la tetraciclina (T Ω) se clonó en el sitio *HindIII* del vector (pNOT Ω *pcrV*). El casete MOB (17) se añadió como un fragmento *NotI*. La selección de merodiploides, la resolución de la secuencia plasmídica, y la confirmación del reemplazo alélico se realizó como se describe previamente (18). Se utilizó un plásmido lanzadera (pUCP, 19), para construir un clon que completase la supresión en *pcrV*. La secuencia que codifica PcrV fue amplificada y clonada tras la región promotora de ExoS (20). La transcripción de ExoS se regula de 20 forma coordinada con los operones que controlan la secreción y la translocación de tipo III en *P. aeruginosa* (2). La secuencia de nucleótidos fue confirmada para cada construcción de ADN que implicaba mutagénesis específica del sitio, amplificación por PCR o supresión dentro del marco de lectura.

SDS-PAGE y análisis por transferencia tipo Western de los productos secretados.

30 Se cultivó *P. aeruginosa* en condiciones inductoras (+ANT) y no inductoras (-ANT) para la expresión de productos de secreción de tipo III (18). Los cultivos se recogieron basándose en medidas de densidad óptica a 540 nm y las fracciones sobrenadantes se concentraron por adición de una disolución saturada de sulfato amónico, hasta alcanzar una concentración final del 55%. Cada carril del gel de poliacrilamida (11%) con SDS se cargó con 3 μ l de sobrenadante concentrado 20 veces y se tiñó con azul de Commassie. Un gel idéntico se sometió a análisis por 35 transferencia Western como se describe previamente (3-5) utilizando una mezcla de antisueros de conejo, que reconocen específicamente ExoU, PopD, y PcrV. Se utilizó proteína A marcada con I¹²⁵ como agente secundario para identificar la IgG unida.

Modelos de infección y evaluación de daño pulmonar.

40 Se utilizaron Células de Ovario de Hámster Chino (CHO, del inglés "Chinese Hamster Ovary) en un modelo de infección *in vitro* diseñado para medir la citotoxicidad y la translocación de tipo III (21). Brevemente, se preparó un inóculo bacteriano en un medio de cultivo de tejidos sin suero. Las células CHO, que se propagaron en un medio que contenía suero, se lavaron e infectaron con varias cepas de *P. aeruginosa* con una multiplicidad de infección 5:1. Los cultivos fueron incubados en condiciones de cultivo de tejidos durante tres horas (37°C, 5 % CO₂), lavados y teñidos con azul de tripano. La permeabilidad al colorante se determinó mediante fotografías de contraste de fases. La infección de una cepa parental PA103, que expresan ExoU, dio lugar a una tinción de aproximadamente el 80% 45 de la monocapa con azul de tripano tras tres horas de incubación, y a la destrucción completa de la monocapa a las 4-5 horas de incubación. Las infecciones de los ratones y la evaluación del daño pulmonar se realizaron como se describe previamente (16). Brevemente, se adquirieron machos de ratón BALB/c de 8 a 12 semanas de edad libres de patógenos procedentes de Laboratorios Simonsen (Gilroy, CA) y se mantuvieron en condiciones de barrera. Los ratones fueron anestesiados previamente con Metofan inhalado(metoxifluaron, Pitman-Moore, Mundelein, IL) y colocados en decúbito supino, con un ángulo de aproximadamente 30°. Se instilaron cincuenta microlitros del inóculo bacteriano lentamente en el lóbulo izquierdo utilizando una aguja de alimentación de animales del calibre 24 modificada (Popper 6 Sons, Inc., New Hyde Park, NY) insertada en la tráquea vía la orofaringe. Para evaluar el daño pulmonar, se añadieron al instilado 0,5 μ Ci de suero de albúmina humano marcado con I¹³¹, y 0,05 μ g de azul de Evans anhidro en ml de lactato Ringer con albúmina de ratón al 5%. Tras 4 horas de infección, los ratones fueron 50 anestesiados, se recogió sangre mediante una punción en la arteria carótida y se realizaron esternotomías medias. Se recolectaron los pulmones, los fluidos pleurales, tráqueas, orofaringes, estómagos e hígados, y se midió la radioactividad. El porcentaje de albúmina radioactiva que abandonó los pulmones instilados y entró en la circulación o en los fluidos pleurales se calculó multiplicando los recuentos medidos en muestras de sangre terminal (por ml) por el volumen de sangre (peso corporal x 0,07). Las proporciones húmedo/seco de los pulmones se determinaron

añadiendo 1ml de agua a los pulmones y homogeneizando la mezcla. Los homogeneizados se colocaron en bandejas de aluminio previamente taradas y se secaron hasta un peso constante en un horno a 80°C durante tres días. Los homogeneizados de pulmón también fueron diluidos secuencialmente y sembrados en agar de sangre de oveja para la evaluación cuantitativa de las bacterias.

5 Producción de antisuero de conejo para PcrV, PopD, y ExoU. Se produjeron rPcrV, rPopD y rExoU como proteínas de fusión con una cola de histidina en pET16b y se purificaron por cromatografía con níquel como se ha descrito previamente (22). Los conejos fueron inyectados por vía intradérmica (10 zonas) con 300 µg de proteína recombinante emulsionada en un coadyuvante completo de Freund, fueron reforzados con un antígeno en un coadyuvante incompleto de Freund, y se sangraron periódicamente a intervalos de 7 días. Para la inmunización pasiva, la fracción de IgG fue aislada utilizando una columna de cromatografía con proteína A (Pierce Chemicals, Roxkford, IL). Los ratones fueron inyectados con 100 µg de IgG (inyección intraperitoneal) una hora después de la prueba de ataque con 5×10^5 UFC de la cepa PA103. Para la inmunización activa con rPcrV y r ExoU, se eliminó la endotoxina de las preparaciones de la proteína por extracción con Triton X-114 al 1-% (23). Después de las extracciones, el Triton X-114 fue eliminado por cromatografía en Sephacryl S-200. Todas las preparaciones de vacunas contenían menos 1 ng de endotoxina por 40 µg de proteína recombinante, como se determinó mediante un ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (bioWhittaker, Walkersville, MD). Los ratones BALB/c fueron inyectados por vía subcutánea con 10 µg de proteína recombinante en coadyuvante completo de Freund. El día 30 se reforzó a los ratones con 10 µg adicionales del antígeno en un coadyuvante incompleto de Freund. El día 51 los ratones se sometieron a una prueba de ataque por instilación de *P. aeruginosa* en sus pulmones izquierdos.

20 4) Síntesis de Anticuerpos Monoclonales

Los ratones fueron inmunizados con 10 µg de PcrV recombinante purificada, libre de LPS, en coadyuvante completo de Freund y se les administró un recuerdo dos semanas después con la misma dosis de antígeno emulsionado en coadyuvante incompleto de Freund. Las inmunizaciones se realizaron por vía subcutánea. Una semana después del refuerzo con las dosis de PcrV en coadyuvante incompleto de Freund se recogieron los bazos de los ratones.

25 Un solo bazo se colocó en 5 ml de medio de cultivo de tejidos sin suero, se cortó en pedazos y se homogeneizó con suavidad. Se permitió que trozos grandes de tejido sedimentasen desde el homogeneizado y el sobrenadante, se eliminó la suspensión de células únicas y se sometió a centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de una disolución para lisar los glóbulos rojos durante 5 minutos y posteriormente se colocaron bajo de 10 ml de suero fetal bovino. El material se centrifugó a 1200 rpm durante 8 minutos, el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 30 ml de medio.

30 Las células de bazo y las células de mieloma (P3x63Ag8.653) se recogieron por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos, y cada sedimentado se resuspendió por separado en 10 ml de medio de cultivo de tejidos. 10^8 células de bazo y 2×10^7 células de mieloma se mezclaron y sedimentaron juntas por centrifugación a 1200 rpm durante 6 minutos. El sobrenadante se eliminó por aspiración y se añadió 1ml de polietilenglicol (PEG) al 35%. Las células se resuspendieron suavemente en esta disolución y se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 minutos. En algunos experimentos se suprimió la centrifugación.

35 Exactamente 8 minutos después de la adición de PEG, se añadieron 25 ml de medio y las células se resuspendieron suavemente. Tras un paso de centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos, el sedimento de células se resuspendió hasta una densidad de 1×10^6 por ml en un medio acondicionado al 30% y en un medio completo (con suero) al 70%. Estas células se incubaron durante una noche a 37°C. Al día siguiente las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 200 ml de un medio acondicionado al 30% y en un medio completo al 70% con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

40 Se añadieron aproximadamente 0,2 ml de esta suspensión celular por pocillo a diez placas de 96 pocillos (12ml por cada placa de 96 pocillos). La densidad de las células restantes se ajustó a $2,5 \times 10^5$ por ml y se sembraron en el formato de 96 pocillos. Las placas se revisaron en el microscopio para detectar colonias únicas y posteriormente se ensayaron los sobrenadante para detectar la producción de anticuerpos mediante un ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas usando PcrV recombinante como antígeno. Los clones que producían anticuerpos reactivos para PcrV se traspasaron a placas de cultivo más grandes y después se determinó su isotipo.

45 La unión a anticuerpos se verificó mediante un ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas utilizando PcrV como antígeno (proteína con colas histidina) recubriendo los pocillos. También se ensayaron los anticuerpos monoclonales en reacciones de transferencia tipo Western utilizando un sobrenadante de *P. aeruginosa* que contiene PcrV nativa sin la cola de histidina.

50 4) Referencias

55 1. Wiener-Kronish, J.P., Sawa, T., Kurahashi, K., Ohara, M. y Gropper, M.A., "Pulmonary edema associated with bacterial pneumonia", Pulmonary Edema (eds. Matthay, M.A. e Ingbar, D.H.) pp. 247-267 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998).

2. Frank, D.W., "The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*", *Mol. Microbiol.* 26:621-629 (1997).
3. Finck-Barbançon, V. et al., "ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury", *Mol. Microbiol.* 25:547-557 (1997).
- 5 4. Yahr, T.L., Goranson, J. y Frank, D.W., "Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway", *Mol. Microbiol.* 22:991-1003 (1996).
5. Yahr, T.L., Mende-Mueller, L.M., Friese, M.B. y Frank, D.W., "Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon", *J. Bacteriol.* 179:7165-7168 (1997).
6. Hueck, C.J., "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:379-433 (1998).
- 10 7. Skrzypek, E. y Straley, S.C., "Differential effects of deletion in *lcrV* on secretion of V antigen, regulation of the low-Ca²⁺ response, and virulence of *Yersinia pestis*", *J. Bacteriol.* 177:2530-2542 (1995).
8. Nakajima, R. y Brubaker, R.R., "Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha", *Infect. Immun.* 61:23-31 (1993).
- 15 9. Nakajima, R., Motin, V.L. y Brubaker, R.R., "Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization", *Infect. Immun.* 63:3021-3029 (1995).
10. Nedialkov, Y.A., Motin, V.L. y Brubaker, R.R., "Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10", *Infect. Immun.* 63:1196-1203 (1997).
11. Nilles, M.L., Fields, K.A. y Straley, S.C., "The V antigen of *Yersinia pestis* regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects on YopB and LcrG", *J. Bacteriol.* 180:3410-3420 (1998).
- 20 12. Kudoh, I., Wiener-Kronish, J.P., Hashimoto, S., Pittet, J.-F. y Frank, D.W., "Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury", *Am. J. Physiol.* 267:L551-L556 (1994).
13. Apodaca, G. et al., "Characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-induced MDCK cell injury: glycosylationdefective host cells are resistant to bacterial killing", *Infect. Immun.* 63:1541-1551 (1995).
- 25 14. Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T. y Frank, D.W., "ExoY, a novel adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press (1998).
15. Finck-Barbançon, V., Yahr, T.L. y Frank, D.W., "Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin", *J. Bacteriol.*, in press (1998).
- 30 16. Sawa, T., Corry, D.B., Gropper, M.A., Ohara, M., Kurahashi, K. y Wiener-Kronish, J.P., "IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia", *J. Immunol.* 159:2858-2866 (1997).
17. Schweizer, H.P., "Allelic exchange in *Pseudomonas aeruginosa* using novel Co1E1-type vectors and a family of cassettes containing a portable oriT and the counter-selectable *Bacillus subtilis* *sacB* marker", *Mol. Microbiol.* 6:1195-1204 (1992).
- 35 18. Frank, D.W., Nair, G. y Schweizer, H.P., "Construction and characterization of chromosomal insertional mutations of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S trans-regulatory locus", *Infect. Immun.* 62:554-563 (1994).
19. Schweizer, H.P., "Escherichia-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19", *Gene* 97:109-112 (1991).
20. Yahr, T.L., Hovey, A.K., Kulich, S.M. y Frank, D.W., "Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene", *J. Bacteriol.* 177:1169-1178 (1995).
- 40 21. Vallis, A.J., Yahr, T.L., Barbieri, J.T. y Frank, D.W., "Regulation of ExoS production by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions", *Infect. Immun.* Submitted.
22. Yahr, T.L., Barbieri, J.T. y Frank, D.W., "Genetic relationship between the 53- and 49-kilodalton forms of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Bacteriol.* 178:1412-1419 (1996)
23. Aidi, Y. y Pabst, M.J., "Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114", *J. Immunol. Methods* 132:191-195 (1990).

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar infección por *Pseudomonas aeruginosa* que comprende la etapa de exponer una muestra del paciente a una sonda de nucleótidos , en la que la sonda se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica PcrV y no con otros ácidos nucleicos.
- 5 2. Un método para diagnosticar una infección por *Pseudomonas aeruginosa* que comprende las etapas de:
 - (a) exponer una muestra del paciente a cebadores de nucleótidos diseñados para amplificar el gen pcrV,
 - (b) llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, en la que el gen pcrV se amplifica si está presente en la muestra, y
 - (c) correlacionar infección por *Pseudomonas aeruginosa* con la presencia de un producto amplificado
- 10 3. Un método para diagnosticar infección por *Pseudomonas aeruginosa*, que comprende las etapas de:
 - (a) exponer un muestra del paciente al antígeno PcrV, y
 - (b) correlacionar infección por *Pseudomonas aeruginosa* con la presencia de un complejo antígeno/anticuerpo específico de PcrV.

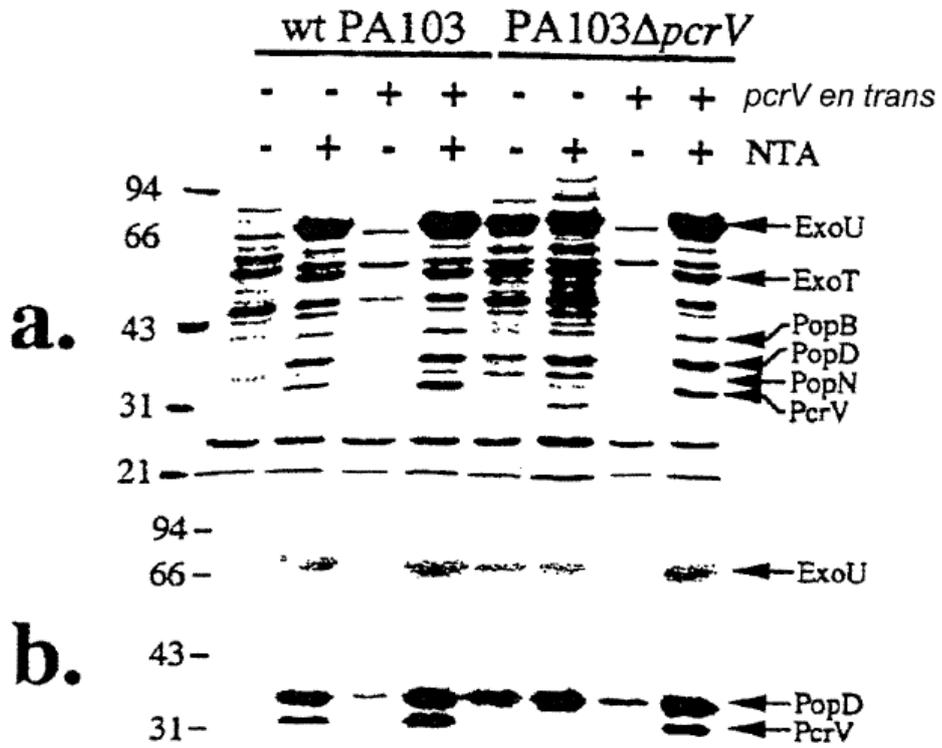


FIG. 1

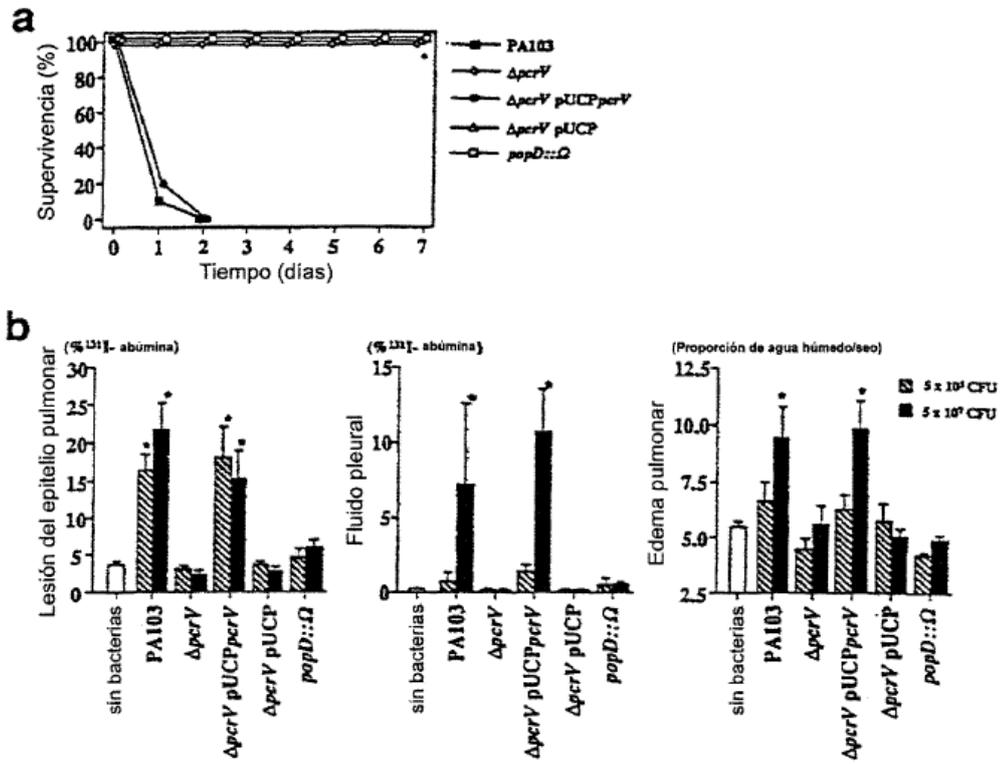


FIG. 2

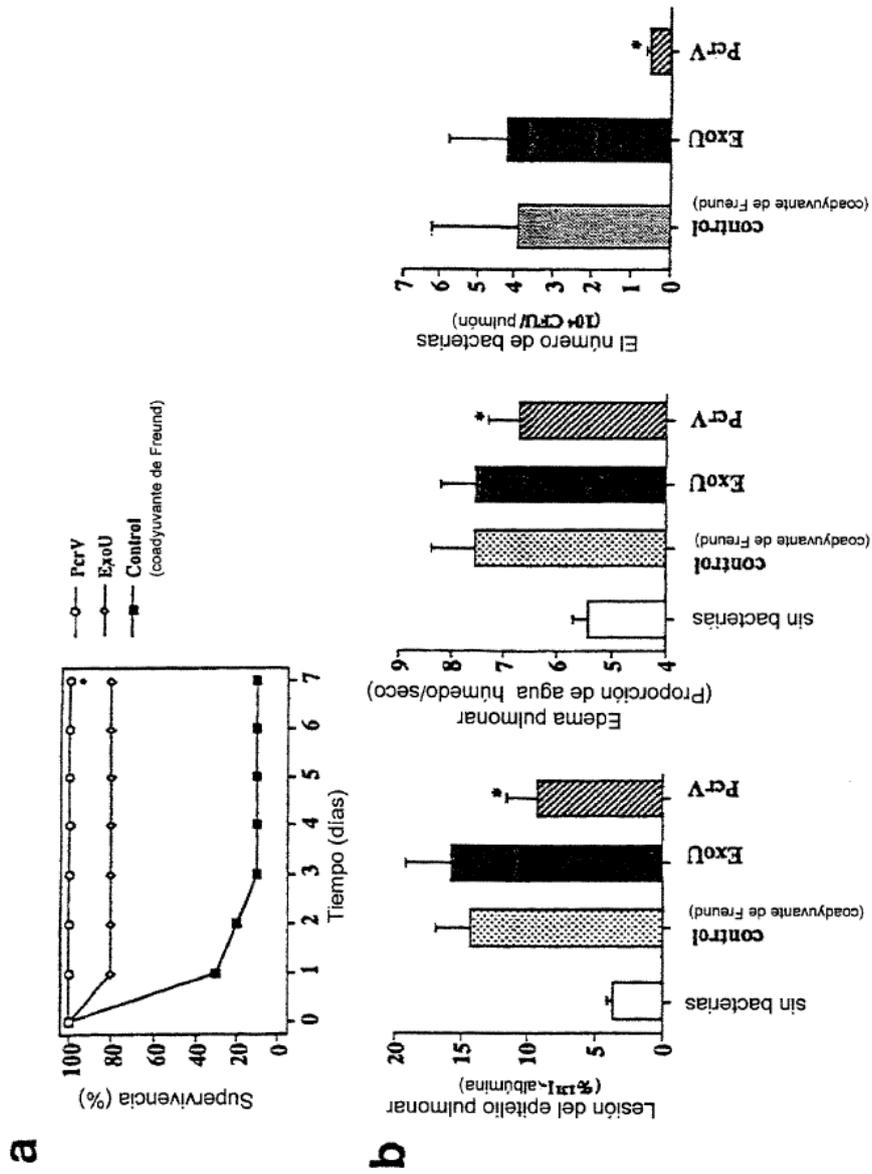


FIG. 3

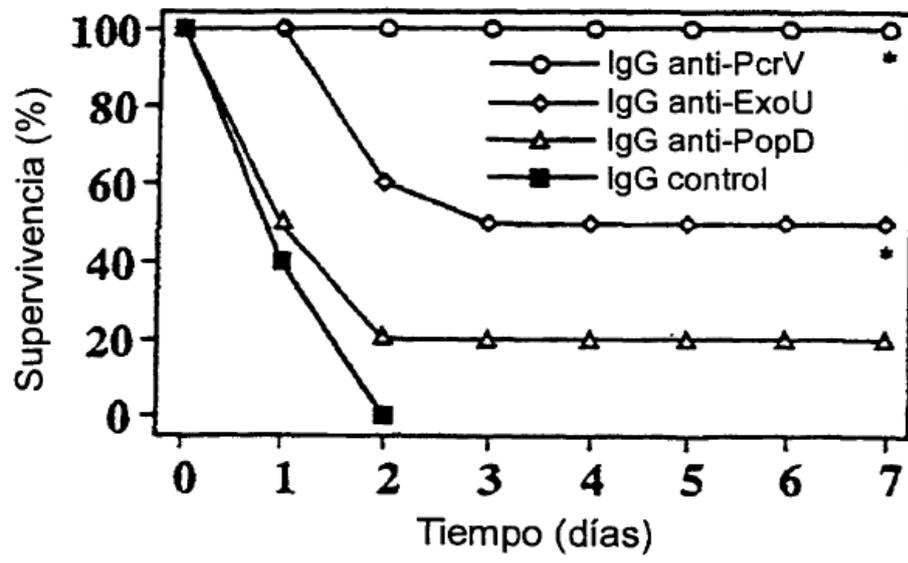


FIG. 4

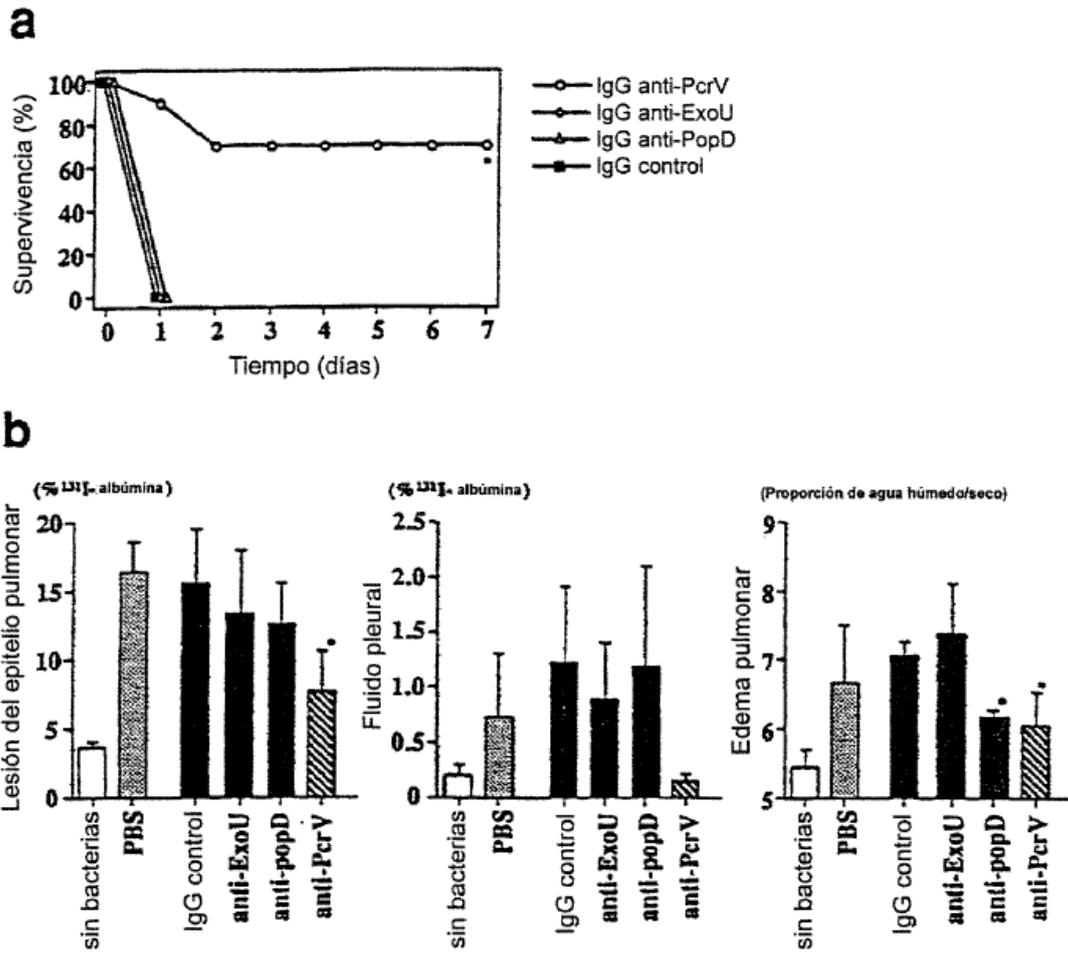


FIG. 5