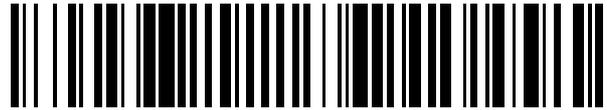


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 413**

51 Int. Cl.:

C07K 14/22 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.1994 E 04030675 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1520860**

54 Título: **Proteínas PiIC recombinantes, método para su producción y uso de las mismas**

30 Prioridad:

26.10.1993 DE 4336530

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2013

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(100.0%)
14195 Berlin , DE**

72 Inventor/es:

**MEYER, THOMAS F. ;
RUDEL, THOMAS ;
RYLL, ROLAND RICHARD y
SCHEUERPFUG, INA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 402 413 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).

DESCRIPCION

Proteínas PilC recombinantes, método para su producción y uso de las mismas

5 La invención se refiere a secuencias génicas recombinantes para sintetizar una proteína que tiene la actividad biológica de la proteína PilC. Además, la invención se refiere a métodos de DNA recombinante para producir proteínas que tienen la actividad biológica de la proteína PilC, así como a las herramientas moleculares-biológicas necesarias para ello. Además, la invención se refiere a proteínas que tienen la actividad biológica de la proteína PilC.

10 Un paso primordial en la aparición y manifestación de cualquier infección es la unión del agente patógeno a ciertas estructuras moleculares (receptores) del organismo hospedador. Las estructuras del patógeno responsables de la unión se denominarán adhesinas. Es posible que sean necesarias múltiples interacciones moleculares entre las adhesinas del patógeno y los receptores del organismo hospedador para la aparición y/o la manifestación de una infección. Por otra parte, es posible que el bloqueo de una única interacción molecular entre una adhesina importante y un receptor sea suficiente para prevenir una infección.

15 El bloqueo de las interacciones moleculares adhesina-receptor es una posible forma de prevención y/o terapia de enfermedades infecciosas. Los planteamientos profilácticos incluyen, por ejemplo, la formación de anticuerpos dirigidos específicamente contra la adhesina y el bloqueo de cualquier interacción con su receptor mediante inmunización activa (vacunación). Sin embargo, la interacción puede ser impedida también principalmente en el sentido de una medida profiláctica o terapéutica mediante anticuerpos administrados pasivamente, u otras sustancias, por ejemplo adhesina o sustancias de análogas al receptor, que se denominarán con el término genérico de inhibidores.

20 Adhesinas importantes de numerosos agentes patógenos gram negativos son los pili (también denominados fimbrias o fibrillas). Son estructuras poliméricas que forman finos apéndices filiformes en la superficie de las bacterias. Los pili hacen posible que las bacterias se fijen a receptores específicos del organismo hospedador mediante las adhesinas contenidas en dichos pili. En algunos casos se ha demostrado que la pérdida de los pili da lugar a la pérdida de infecciosidad del agente patógeno. Esta pérdida de infecciosidad puede explicarse por la pérdida de la capacidad de formar uniones. Por consiguiente, el bloqueo de la interacción molecular entre la adhesina del pilus y el receptor puede evitar o detener subsiguientemente la infección del organismo hospedador.

30 En las bacterias gram negativas se conocen diferentes tipos de pili. La mayoría de los pili conocidos son estructuras heteropoliméricas que comprenden varias subunidades, una subunidad principal y otras subunidades inferiores que están presentes en solamente unas pocas copias. En algunos casos bien examinados las subunidades inferiores son las estructuras adhesivas reales (adhesinas), mientras que la subunidad principal que está presente en un elevado número de copias adopta la función de un marco (Lindberg et al., Nature 328, 84-87, 1987).

35 Numerosas especies de bacterias patógenas gram negativas forman pili de tipo 4, que se denominan también N-Me-Phe o pili de tipo IV. Incluyen las especies patógenas *Neisseria*, *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, que causan gonorrea y meningitis bacteriana, respectivamente, en las personas. Sin embargo, hasta ahora no hay una vacuna eficaz contra *N. gonorrhoeae*. Sin embargo, se dispone de vacunas específicas de la cápsula contra algunos serogrupos de *N. meningitidis*; desgraciadamente, ofrecen una protección solamente parcial y se consideran problemáticas en cuanto a la inmunología. Las infecciones se tratan habitualmente con antibióticos; sin embargo, la resistencia cada vez más alta de los agentes patógenos a los antibióticos causa problemas. El desarrollo de métodos de tratamiento alternativos es por tanto urgente. Otro patógeno importante que forma pili de tipo 4 en los seres humanos es la *Pseudomonas aeruginosa* (Sastry et al., FEBS Letters 151, 253-255, 1983), que es un problema central para los pacientes que padecen de fibrosis quística, inmunodeficiencias y en relación con infecciones sépticas. Todavía no se dispone de vacunas eficaces y/o inhibidores de este patógeno; sobre todo es problemática la creciente diseminación de cepas multirresistentes. Por tanto se necesitan urgentemente métodos alternativos de tratamiento en este campo. Más ejemplos de patógenos importantes que forman pili de tipo 4 son *Escherichia coli* enteropatógenas (EPEC; Giron et al, Science 254, 710-713, 1991), *Vibrio cholerae* (Shaw et al, Infect Immun 58, 3042-3049, 1990), *Bacteroides nodosus* (McKern et al., FEBS Letters 164, 149-153, 1983), *Moraxella bovis* (Marrs et al., J. Bacteriol. 163, 132-139, 1985) y otros patógenos, que causan enfermedades en los seres humanos y en animales, y contra los cuales se buscan vacunas de un modo intensivo.

50 Los pili de tipo 4 se definen por la estructura de su subunidad principal, conocida normalmente como pilina; además de esto, hay términos específicos para la subunidad principal de pilina para especies individuales de bacterias, p. ej. PilE para *N. gonorrhoeae* o PilA para *Pseudomonas aeruginosa*. La estructura de la pilina de pili de tipo 4 difiere sustancialmente de la de subunidades principales de otros tipos de pilus, tales como el grupo de pili de tipo papilla ("pap-like") (Baga et al. J. Bacteriol. 157, 330-333, 1984). Son características de la pilina de pili de tipo 4 (a) la corta secuencia señal aminoterminal, cargada positivamente, de la proforma de la pilina (con la excepción de la pilina tipo 4 de *V. cholerae*), (b) la porción hidrófoba amino terminal de la pilina madura, que muestra una intensa homología de secuencia entre diferentes pilinas de tipo 4, (c) la modificación del resto amino terminal Phe de la pilina madura por medio de un grupo metilo en posición N (N-Me-Phe), (d) dos restos Cys en la porción carboxi terminal de la pilina que forman un bucle y (e) una propiedad denominada movilidad espasmódica.

Hasta ahora, las proteínas PilC fueron detectadas como componentes de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. Hasta el momento, se consideró que una función de montaje en la biogénesis del pilus era una función de estas proteínas PilC (Jonsson, Dissertation, New Series No. 322, Universidad de Umea, ISSN 0346-6612). Sin embargo, estos trabajos nunca indicaron un posible papel como adhesina importante. En otros experimentos, los científicos consiguieron aislar mutantes de *N. gonorrhoeae* que sí que formaban aún Pili, pero no mostraban ya adherencia con las células epiteliales (Rudel et al., Mol. Microbiol. 6, 3439-3450, 1992). Estos mutantes resultaron ser cepas variantes de fase que habían dejado de producir proteínas PilC. De estos experimentos no pudo derivarse una función directa de las proteínas de *Neisseria* PilC. Sin embargo, los experimentos indicaron que el ensamble de los pili de *Neisseria* puede tener lugar también si no hay presentes proteínas PilC. Los científicos han conseguido clonar un gen que codifica la proteína PilC en *E. coli*. Esto se logró mediante la purificación por electroforesis en gel de la proteína PilC de pili de *Neisseria* aislados (Jonsson et al., EMBO J. 10, 477-488, 1991 y el documento WO 9213871). La proteína PilC purificada mediante electroforesis en gel se usó para obtener el antisuero. La proteína PilC purificada mediante electroforesis en gel no tenía actividad biológica en el sentido de esta invención. Así pues, el antisuero correspondiente no tiene la propiedad de esta invención de bloquear la unión de *Neisseria* piliada a las células epiteliales. Utilizando el antisuero, los científicos han tenido éxito en primer lugar en la identificación de un clon de fago de *E. coli* que lleva un gen que codifica PilC parcialmente. Pudo identificarse un clon de *E. coli* con un gen de codificación de PilC intacto por medio del gen de codificación parcial de PilC utilizando la hibridación de DNA (Jonsson et al. EMBO J. 10, 477-488, 1991, WO 9213871). Este gen que codifica PilC recombinante era traduccionalmente inactivo debido a su secuencia homopolimérica variable, de forma que no tuvo lugar una síntesis de proteína PilC biológicamente activa. Se conoce la secuencia de nucleótidos de este primer gen de codificación de PilC (PilC1) procedente de la cepa de *N. gonorrhoeae* MS11; también se conoce una secuencia parcial de un segundo gen (PilC2) procedente de esta cepa (Jonsson et al., EMBO J. 10, 477-488, 1991; Jonsson, Dissertation, Nex Series N ° 322, Universidad de Umea, ISSN 0346-6612 y WO 9213871). Sin embargo, ninguno de estos genes ha hecho posible producir PilC.

Así pues, el problema técnico subyacente de la invención es esencialmente proporcionar proteínas biológicamente activas que tengan la actividad biológica de la proteína PilC. Este problema técnico se resuelve proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Por tanto, la invención se refiere al método para la producción de una proteína esencialmente pura que tiene la actividad biológica de la proteína PilC, en donde la actividad significa que la proteína soporta el ensamblaje de pili de tipo-4, media la unión de bacterias que llevan pili de tipo 4 a los receptores en células epiteliales humanas o muestra la adecuación inmunológica para inducir anticuerpos contra las bacterias que llevan pili de tipo 4 que compiten con la unión de las bacterias a sus receptores en las células epiteliales humanas y preferiblemente bloquean la unión, obtenible de acuerdo con un método en el que una célula hospedadora se desarrolla bajo condiciones adecuadas con un vector recombinante que contiene una secuencia génica recombinante para la síntesis de la proteína, como se muestra en la Figura 4, cuya porción de secuencia de fase variable que codifica el péptido señal y que contiene una secuencia de nucleótidos homopolimérica se caracteriza por la modificación siguiente:

(a) sustitución de la porción de secuencia de fase variable que codifica el péptido señal por una secuencia de nucleótidos heteropolimérica, no de fase variable que comprende CATAACGGTGGAGGTGGTGGAGCG, que codifica un péptido señal que es compatible con la secreción de la proteína PilC,

de forma que la expresión de la secuencia genética recombinante en una célula hospedadora se hace posible no afectada por variaciones de fase, y la proteína se purifica.

Estas secuencias de ADN de la invención sirven para la expresión de proteínas que tienen la actividad biológica de la proteína PilC.

En esta invención, la expresión "actividad biológica de la proteína PilC" se refiere a la capacidad de la proteína codificada para soportar el ensamblaje de pili de tipo 4, para mediar la unión de bacterias que llevan pili de tipo 4 a los receptores celulares o a la adecuación inmunológica para la inducción de anticuerpos contra bacterias que llevan Pili de tipo 4, que compiten con la unión de las bacterias a sus receptores celulares y preferiblemente bloquean la unión.

De acuerdo con esta invención, el término "proteína" se refiere a proteínas de origen natural o a modificaciones o fragmentos de las mismas que muestran la actividad biológica anteriormente mencionada.

La expresión "bacterias patógenas que llevan pili de tipo 4" como se usa en esta invención se refiere a bacterias que, por una parte, están en relación causal con la patogénesis de enfermedades y, por otra parte, como un elemento esencial de su propiedad patogénica, forman pili de tipo 4, que son necesarios para la unión de la bacteria a los receptores celulares en el organismo hospedador infectado.

"Homopolímeros" son secuencias de nucleótidos que consisten en una secuencia de nucleótidos idénticos (p. ej. 5'-CCCCCC-3'). En esta invención, las "secuencias de nucleótidos homopoliméricas" se definen por su propiedad de añadir espontáneamente o de forma inducida uno o varios nucleótidos idénticos a la secuencia de nucleótidos homopolimérica existente o perderlo del mismo. La adición o la pérdida, respectivamente, de nucleótidos idénticos

en secuencias de nucleótidos homopoliméricas tiene por resultado una "variación de fase". Esta variación de fase es causada mediante un proceso RecA-proteína independiente, que tiene lugar sustancialmente de forma espontánea (Robertson & Meyer, Trends Genet. 8, 422-427, 1992). Los cambios en la secuencia de nucleótidos que subyacen a la variación de fase tienen un efecto en el marco de lectura traduccional de un gen y por lo tanto la formación del producto génico intacto. En el sentido de esta invención, la variación de fase no es deseable porque bajo el control de un promotor fuerte, la variación de fase del DNA que codifica PilC causará un marco de lectura cambiado y por ello una pérdida de la formación de la proteína deseada que tiene la actividad biológica de la proteína PilC. Una "secuencia de nucleótidos heteropolimérica invariable" en el sentido de esta invención es por consiguiente una secuencia de nucleótidos derivada de una secuencia de nucleótidos homopolimérica por la adición o el intercambio de nucleótidos no idénticos (esto es, en el caso de la secuencia 5'-GGGGGGGGGGGG-3' los nucleótidos A, C y/o T) y, debido a estas modificaciones, se ha convertido en "no fase variable", es decir, no muestra variaciones de fase. Debido al código genético, es posible modificar la secuencia de nucleótidos homopolimérica de forma que la secuencia de aminoácidos codificada permanezca sin cambios o bien cambie también.

Un "péptido señal" como se usa en esta invención es una secuencia de aminoácidos en el extremo amino de la proforma de una proteína segregada a partir de bacterias gram negativas. Un péptido señal hace que sea posible segregar una proteína a través de la ruta de exportación general de la membrana interna de la bacteria (Pugsley, Microbiol. Rev. 57, 50-108, 1993). El péptido señal de fase variable que codifica la porción de la secuencia génica de esta invención se modifica por sustitución de la porción de fase variable que codifica el péptido señal que es de fase variable debido a la secuencia de nucleótidos homopolimérica contenida en el mismo. La sustitución es un reemplazo parcial o completo de la porción de secuencia que codifica el péptido señal con otra secuencia que codifica el péptido señal que permite la secreción de la proteína PilC a través de la ruta de exportación general mencionada, que no contiene secuencias de nucleótidos homopoliméricas de fase variable y que, tomada en su conjunto, es una secuencia de nucleótidos no de fase variable. El cambio (sustitución) se lleva a cabo con el objetivo de hacer posible la expresión de la secuencia génica en una célula hospedadora sin ninguna influencia por variaciones de fase con el fin de garantizar la formación de proteína PilC bajo condiciones estables y en grandes cantidades (sobreproducción). La hibridación de DNA cromosómico de, por ejemplo, *N. gonorrhoeae* con un gen PilC completo como muestra indica que existen dos genes PilC relacionados en el cromosoma de esta especie. Sin embargo, si usan como muestra los fragmentos subgénicos de un gen PilC, pueden hacerse visibles más genes de hibridación cruzada que son también genes PilC que, sin embargo, están relacionados solamente de forma lejana. La detección de tales genes PilC relacionados lejanamente se basa en la hibridación cruzada de porciones constantes de la secuencia de DNA entre dos o más genes PilC relacionados. Las porciones constantes de la secuencia de DNA pueden ser definidas por medio de una comparación de secuencias entre dos genes relacionados. La definición de porciones constantes de la secuencia de DNA tiene así por resultado la posibilidad de identificar también genes PilC relacionados lejanamente. La comparación de secuencias repetidas con tal gen relacionado lejanamente, a su vez, tiene por resultado nuevas porciones constantes de la secuencia de DNA que, de nuevo, pueden ser usadas para la identificación de genes PilC, etc. De esta forma, todos los miembros de la familia de genes PilC dentro y fuera de una especie bacteriana pueden ser detectados gradualmente.

Las secuencias de genes recombinantes de esta invención hacen posible producir proteínas que tienen la actividad biológica de la proteína PilC en cantidades considerables. Esto hace también posible la identificación general de subunidades inferiores de los pili del tipo 4 y su caracterización fiable como adhesinas. La invención permite, en particular, la detección de las proteínas PilC de *Neisseria patógena* (*N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*) en su función como adhesinas importantes. Además, la invención permite la detección de proteínas análogas a PilC de otras especies de bacterias que forman pili de tipo 4. La detección de acuerdo con esta invención de la función de adhesina de una subunidad inferior de un pilus de tipo 4 y/o proteínas análogas a PilC no ha sido descrita hasta ahora para ninguna especie bacteriana que produce pili de tipo 4. La expresión "proteína análoga a PilC" se refiere exclusivamente a la relación estructural (de secuencia de nucleótidos y aminoácidos) con las proteínas PilC de la *Neisseria patógena* y a la función análoga con las proteínas PilC de *Neisseria* como adhesinas de unión con el receptor. Las proteínas PilC análogas de otras especies bacterianas que forman pili de tipo 4 de esta invención no son necesariamente idénticas o relacionadas con las proteínas que se citan como PilC en la bibliografía (por ejemplo, la proteína PilC conocida de *Pseudomonas aeruginosa* (Nunn et al., J. Bacteriol. 172, 2911-2919, 1990) no es una proteína análoga a PilC de acuerdo con esta invención).

La subunidad principal de los pili de tipo 4 fue erróneamente considerada una adhesina importante en algunos casos (Rothbard et al, PNAS (USA) 82, 919, 1985; Paranchych, en: The Bacteria Vol. XI, Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis, Academic Press, 61-78, 1990, y citas en el mismo). Basándose en estos hallazgos y/o hipótesis, se han hecho numerosos intentos de bloquear la adherencia de las bacterias a células humanas o animales utilizando anticuerpos y/o bloqueantes de la adherencia o para detener una infección bacteriana por medio de la vacunación utilizando la subunidad principal de pilus de tipo 4. A pesar del éxito parcial (Paranchych en: The Bacteria Vol. XI, Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis, Academic Press, 61-78, 1990, y las citas en el mismo; Tramont, Clin. Microbiol. Rev. 2, 74-77, 1989, y citas en el mismo) no ha sido todavía posible desarrollar una vacuna ampliamente eficaz o un inhibidor ampliamente eficaz basándose en la subunidad principal de los Pili de tipo 4. Hay dos posibles explicaciones: (a) La subunidad principal de un pilus de tipo 4 no comprende funciones de adherencia importantes de forma que la unión de los pili al receptor no está bloqueada y/o (b) las vacunas o el inhibidor no son eficaces o no son eficaces de forma suficientemente amplia debido a la variabilidad estructural de la subunidad principal de pilina.

Esta última explicación se refiere a la suposición de que una vacuna dirigida contra la pilina podría causar una pérdida completa de la capacidad de los pili para adherirse, independiente de si la pilina es una adhesina o no. El efecto de los anticuerpos dirigidos contra la pilina podría afectar a la función de la estructura de la pilina y así indirectamente a las propiedades de adherencia de los Pili en su conjunto. El hecho de que este camino, obviamente, no conduce al éxito (Johnson et al., J. Infect. Dis. 163, 128-134, 1991) se debe principalmente a la mencionada variabilidad estructural de la pilina. Se sabe que la pilina de especies bacterianas que forman pilus de tipo 4 muestra variabilidad estructural específica inter-cepas y/o específica intra-cepa. Esta variabilidad estructural es la razón para que un bloqueo indirecto de la adherencia por medio de anticuerpos dirigidos contra la subunidad de pili principal variable no sea ampliamente eficaz, sino que esté en cambio limitado a esa cepa específica o a la variante. Es por esto por lo que ha sido imposible desarrollar una vacuna ampliamente eficaz sobre la base de la subunidad principal de pili (pilina).

Las proteínas PilC que ahora pueden ser producidos utilizando las secuencias génicas de la presente invención, p. ej. las de *Neisseria patógena*, muestran también una variabilidad estructural, como se puede observar, por ejemplo, al comparar las secuencias de nucleótidos de codificación (Fig. 4). Contrariamente a la variabilidad de la pilina, sin embargo, la variabilidad de las adhesinas PilC es marcadamente menor y no tiene ningún efecto (o su efecto es insignificante) en la función de las proteínas PilC, a saber, la interacción molecular con el receptor. Esta afirmación viene apoyada por los experimentos de competición con la proteína PilC biológicamente activa (Tab. 2) ya que las bacterias que forman también moléculas de pilina y/o proteínas PilC pueden ser desplazadas utilizando la misma proteína PilC. Así pues, aunque las proteínas PilC que varían en estructura se forman dentro de una especie, estas proteínas PilC de una especie reconocen los mismos receptores o solamente unos pocos receptores diferentes en el organismo hospedador. Por consiguiente es posible desarrollar una vacuna ampliamente eficaz y/o inhibidores de la adherencia ampliamente eficaces basándose en solamente unas pocas formas variantes de las proteínas PilC de una especie. Además, esta invención hace posible desarrollar análogos de receptores ampliamente eficaces basados en tan sólo uno o unos pocos receptores.

Estas posibilidades son válidas también para las adhesinas análogas a PilC formadas por las bacterias que forman pili de tipo 4 que no pertenecen a la especie *Neisseria*. Se puede suponer que el tropismo de células, de tejidos y de hospedador de una especie está determinado en gran medida por la interacción de las adhesinas con sus correspondientes receptores celulares. Estos tropismos son muy acusados en muchos patógenos, en particular también en las bacterias que forman pilus de tipo 4. De este hecho puede deducirse que también las adhesinas análogas a PilC de esta invención de una especie con sus tropismos definidos interactúan tan sólo con uno o unos pocos receptores de células, tejidos y hospedadores específicos. Esto proporciona la ocasión de desarrollar vacunas ampliamente eficaces y otros inhibidores de una infección basándose en las adhesinas análogas a PilC de otras especies y/o de sus receptores correspondientes a la utilización de las adhesinas PilC de la *Neisseria*.

Un aspecto importante de la presente invención fue detectar la función de las proteínas PilC como adhesinas importantes en conexión con la incidencia de una infección. Para hacer esto, fue necesario recuperar la proteína PilC biológicamente activa en forma pura y demostrar su actividad biológica en los sistemas de ensayo adecuados.

Para la producción de una secuencia génica recombinante de esta invención, se aisló el gen PilC2 completo de la cepa MS11 de *N. gonorrhoeae* sobre la base de la información disponible acerca de PilC1 y su gen, y se clonó en *E. coli*. Con el fin de producir la proteína de esta invención que tiene la actividad biológica de una proteína PilC del género *Neisseria* partir de este gen, fue modificada la porción de secuencia homopolimérica que codifica el péptido señal de fase variable del gen PilC2 de forma que se hace posible la expresión de los genes recombinantes en una célula hospedadora sin afectar por la variación de fase. Esto se logró mediante la modificación de la porción de secuencia homopolimérica para formar una secuencia heteropolimérica usando oligonucleótidos adecuados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ejemplo 2).

En una realización preferida, la secuencia génica de esta invención puede obtenerse mediante la modificación de una secuencia de DNA derivada de una bacteria patógena que lleva pili de tipo 4. Este grupo de bacterias fue caracterizado con detalle anteriormente. Ejemplos de tales bacterias son *Neisseria*, en particular *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, *Pseudomonas*, en particular *P. aeruginosa*, *Escherichia enteropatógena*, en particular *E. coli* (EPEC), *Vibrio cholerae*, *Bacteroides nodosus* y *Moraxella bovis*.

En una realización de esta invención particularmente preferida, la secuencia génica se puede obtener mediante la modificación de una secuencia de DNA procedente de una bacteria del género *Neisseria*, preferiblemente *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria meningitidis*.

De acuerdo con la invención, son particularmente preferidas las secuencias génicas del gen PilC2 de *N. gonorrhoeae* y del gen PilC A1493 de *N. meningitidis* que se muestran en la Figura 4. Las secuencias mostradas se inician en la posición 1 con el codón ATG que codifica el primer aminoácido (Met). La porción que codifica el péptido señal llega desde la posición 1 a la 99, basándose en el gen PilC2. La porción de secuencia homopolimérica de fase variable está contenida en la misma, llegando desde la posición 79 a la 91. Los nucleótidos constantes de las secuencias mostradas están marcados con asteriscos. Las porciones de secuencias constantes individuales de los genes PilC1 y PilC2 se muestran por separado en la Tabla 3.

Experimentos de hibridación de DNA con el gen PilC1 completo, con fragmentos del gen PilC1 obtenido por medio de endonucleasas de restricción, o con la porción génica previamente conocida del gen PilC2 de MS11 de *N. gonorrhoeae*, indicaron la existencia de 2 (Jonsson et al., EMBO J. 10, 477-488, 1991), o como máximo 3, respectivamente, (Bihlmaier et al., Mol. Microbiol. 5, 2529-2539, 1991) genes PilC relacionados dentro de esta cepa. La determinación de la secuencia de nucleótidos del segundo gen PilC completo de esta invención (PilC2) y la comparación de las dos secuencias de nucleótidos de PilC (Fig. 4) hace posible, de acuerdo con esta invención, determinar porciones conservadas de los genes PilC (Tabla 3). Pueden entonces usarse los correspondientes fragmentos conservados subgénicos y/o oligonucleótidos de un gen PilC, a diferencia de los genes completos y/o fragmentos génicos mayores, como sondas de hibridación, debido a sus correspondientes homologías con los genes relacionados con secuencias de nucleótidos conservadas, con el fin de identificar y aislar en su totalidad tales genes relacionados.

Así pues, la secuencia génica de esta invención está disponible en otra realización mediante la modificación de una secuencia de DNA que se hibrida con una porción constante de la secuencia de DNA de la Figura 4 y/o la Tabla 3 y codifica una proteína que tiene la actividad biológica de la proteína PilC.

Por tanto, un objeto más de la invención son secuencias génicas que se hibridan con una región constante de la secuencia génica como se muestra en la Figura 4 o en la Tabla 3, respectivamente, que codifican una proteína que tiene la actividad biológica de la proteína PilC y se derivan de una bacteria patógena que lleva pilus de tipo-4 que no pertenece al género *Neisseria*.

De acuerdo con esta invención, la longitud de una secuencia de nucleótidos homopolimérica modificada para formar una secuencia de nucleótidos heteropolimérica asciende a 5 o más nucleótidos. Los ejemplos de secuencias dados en la Figura 4 son 12 G (PilC1), 13 G (PilC2), 9 G (PilC A1493); compárese la posición 79 a la posición 91 sobre la base de la secuencia génica PilC2.

En otra forma de realización preferida de esta invención, la secuencia génica modificada codifica una proteína que tiene la actividad biológica de la proteína PilC, y que muestra una porción de oligohistidina adecuada para su purificación. Preferiblemente, esta porción de oligohistidina contiene 6 restos de histidina (His₆). La presencia del péptido His₆ hace posible unir selectivamente la proteína PilC de esta invención a una columna de níquel-NTA (Ni-ácido nitrilo triacético)-agarosa (Hochuli et al., J. Chromat. 411, 177-184, 1987 ; Hochuli et al, Bio / Techno 6, 1321-1325, 1988) siendo la proteína eluida proteína PilC pura.

En una realización de esta invención preferida en particular, la porción de oligohistidina está localizada en el término N o el término C de la forma madura de las proteínas codificadas. Esto garantiza una estructura espacial de la proteína que es menos propensa a perturbaciones.

En otra realización, la invención se refiere a vectores recombinantes que comprenden una secuencia génica de esta invención. Ejemplos de tales vectores son los vectores pBR322 y pBA que se replican en *E. coli*, vectores basados en los bacteriófagos M13, fd o lambda, vectores de amplio margen de huésped, vectores lanzadera que corresponden a los vectores Hermes (Kupsch et al., presentado para publicación), que hacen posible incorporar genes clonados en el DNA de la célula de *Neisseria* receptora así como el plásmido p tetM25.2, que puede ser utilizado para la transferencia conjugativa de genes entre *Neisseria* (Kupsch et al., presentado para publicación).

En una realización preferida de los vectores de esta invención, la secuencia génica mencionada es controlada por un promotor. Ejemplos de promotores adecuados de acuerdo con esta invención son promotores que son funcionales en las bacterias gram negativas y, en particular, los promotores inducibles. En una realización de esta invención especialmente preferida, el promotor es P_{trc}, que puede ser reprimido en *Neisseria* y *E. coli* así como inducido en presencia de IPTG en la presencia de un gen lacI^q expresado.

En otra realización, la invención se refiere a células hospedadoras que comprenden uno o varios vectores recombinantes de esta invención.

Las células hospedadoras de esta invención sirven para la replicación, la transcripción y la traducción de la secuencia génica de esta invención para la síntesis de una proteína que tiene la actividad biológica de la proteína PilC. Son preferiblemente bacterias gram negativas que hacen posible segregar la proteína sintetizada a través de la membrana interna y la pliegan correctamente. Ejemplos de tales células hospedadoras son *E. coli* K12 y otras bacterias gram negativas, para las cuales se dispone de los vectores de clonación adecuados. Preferiblemente, la célula hospedadora de esta invención es una cepa de *Neisseria* no piliada, que, como *N. gonorrhoeae* N174, ha perdido su capacidad para formar sus pili debido a un gen pilE defectuoso. El gen pilE codifica la subunidad principal (pilina) de los pili de *Neisseria*. Debido al gen pilE defectuoso, no se sintetiza pilina lo que hace posible recuperar proteína PilC biológicamente activa absolutamente libre de pilina.

En otra realización, la invención se refiere a métodos para la producción de una proteína sustancialmente pura que tiene la actividad biológica de la proteína PilC, que comprende cultivar una célula hospedadora de esta invención bajo condiciones adecuadas y purificar la proteína.

En una realización preferida del método de producción de esta invención, la purificación de la proteína que tiene la actividad biológica de la proteína PilC tiene lugar por medio de una cromatografía de afinidad, preferiblemente una cromatografía de afinidad en la que las porciones de oligohistidina contenidas en la proteína de esta invención se utilizan para la unión de la proteína.

5 Las figuras muestran:

Figura 1:

Mapas de restricción de los plásmidos pTR27 y pIS26. El plásmido pTR27 comprende el gen PilC2 natural de la cepa de *N. gonorrhoeae* MS11-N133. Partiendo de este plásmido, se creó una secuencia génica de esta invención en varias etapas (Ejemplo 2, Figura 2), la cual secuencia está presente en forma clonada en el plásmido pIS26. El plásmido PIS26 es una construcción Hermes (Kupsch et al., presentado para publicación), que permite tanto la replicación en *E. coli* como la inserción de la secuencia génica recombinante de esta invención en el plásmido conjugativo ptetM25.2 en *N. gonorrhoeae*. Esta inserción tiene lugar mediante la transferencia de la secuencia génica contenida en la caja lanzadera por medio de la recombinación homóloga doble en las dos porciones de puntos de pIS26 con ptetM25.2.

15 Figura 2:

Esquema de construcción de la secuencia génica recombinante para sintetizar la proteína PilC de esta invención. La descripción del trabajo realizado se puede encontrar en el Ejemplo 2. La porción de DNA que se muestra en esta Figura corresponde a la porción 5' terminal del gen PilC2 contenida en pTR27 (véase la figura 1). Los términos "TR..." se refieren a los oligonucleótidos usados (Ejemplo 2). (A) Modificación del péptido señal de fase variable que codifica la porción de secuencia que contiene una secuencia de nucleótidos homopolimérica. (B) Inserción de una secuencia de nucleótidos que codifica péptido His6. (C) Aclaraciones relativas a (A y B).

Figura 3:

Electroforesis en gel analítica de pili purificados de la cepa de *N. gonorrhoeae* de tipo silvestre N137 (1) y el doble mutante de *N. gonorrhoeae* PilC negativo N474 (2), así como de la proteína PilC2 biológicamente activa de esta invención (3). El aislamiento de los pili se lleva a cabo de acuerdo con Jonsson et al. (1991); la recuperación de la proteína PilC2 de esta invención se describe en el Ejemplo 3.

Figura 4:

Secuencias de nucleótidos de los genes PilC naturales. (A) Comparación de las secuencias de nucleótidos de los genes PilC1 y PilC2 de *Neisseria gonorrhoeae* MS11-N133; (B) Comparación de las secuencias de nucleótidos del gen PilC1 de *Neisseria gonorrhoeae* MS11-N133 con la secuencia génica parcial de un gen PilC de *Neisseria meningitidis* A1493; (C) Comparación de la secuencia de nucleótidos del gen PilC2 de *Neisseria gonorrhoeae* MS11-N133 con la secuencia génica parcial de un gen PilC de *Neisseria meningitidis* A1493. Los ejemplos de las porciones conservadas de esta invención están marcados con asteriscos. Las modificaciones llevadas a cabo para la construcción de la secuencia génica recombinante de esta invención se muestran en la Figura 2.

35 Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento del gen PilC2 de *N. gonorrhoeae*

Basándose en las secuencias parciales de PilC1 y PilC2 publicadas por Jonsson et al. (EMBO J. 10; 477-488, 1991), se construyeron las sondas de oligonucleótidos específicas (para PilC1: CG31 CGATGGCGCAAACCCATCAA; para PilC2: CG32 CGCAGGCGCAAACCCGTAAA), por medio de las cuales ambos genes PilC pudieron ser aislados de un banco de genes de plásmido de DNA genómico de *Neisseria gonorrhoeae* MS11. Con este fin ambas sondas se marcaron radiactivamente usando DNA cinasa en el extremo 5' y se hibridaron frente a aproximadamente 30000 clones del banco de genes. Los clones positivos se aislaron, se hibridó de nuevo contra de las sondas marcadas radiactivamente y finalmente se caracterizaron. Uno de los plásmidos obtenidos (pTR27, véase la Figura 1) contenía el gen PilC2 entero, careciendo, sin embargo, del promotor para sintetizar la proteína PilC. El pTR27 es la construcción básica para la determinación de la secuencia de DNA del gen PilC2 y para la modificación de las secuencias de DNA y de proteína usando métodos de ingeniería genética (véanse el Ejemplo 2 y el Ejemplo 6).

Ejemplo 2: Construcción de una cepa de *N. gonorrhoeae* que sobreproduce proteína PilC

La modificación de la secuencia de nucleótidos homopolimérica, que consistía en 13 nucleótidos G en el caso del gen PilC2 clonado, se logró en dos etapas mediante mutagénesis dirigida por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En estas reacciones, el plásmido pTR27 (véase el Ejemplo 1, Figura 1) sirvió como plantilla. La primera etapa (primera PCR) comprendió dos reacciones PCR distintas del gen PilC2 que tiene los pares de cebadores TR12 (TTGGATCCGACGTCCGAAAAGGAAATACGATG) y TR28 (GCTCCACCACCTCCGCCGGTATGGGAAAAC), así como TR27 (ACGGCGGAGGTGGTGGAGCGCAGGCGCAAACCCGT) y TR23 (TGTGTCTCTGCATATGACG) (Figura 1). Las

LDAO (N, N-dimetil dodecil amina-N-óxido) y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. Después de centrifugar durante 60 minutos a 20.000 rpm (4 °C) en el rotor SS34, el sobrenadante en el que se disolvió la proteína PilC biológicamente activa, fue purificado por medio de cromatografía de afinidad de quelato de níquel. Con este fin, se preparó una columna de níquel-NTA (Ni-ácido nitrilo triacético)-agarosa que contiene 300 µl de volumen de columna, se lavó con 5 volúmenes de agua bidestilada y se aplicaron 10 ml del sobrenadante con la proteína PilC extraída. Lavando la columna con 300 µl de TRIS.Cl 50 mM, imidazol 50 mM, 10% de glicerina, pH 8,0, se eliminaron las proteínas unidas inespecíficamente a la columna de níquel-NTA-agarosa. Después de lavar la columna con 5 a 10 volúmenes de Na_xH_xPO₄ 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7,5 (PBS), la proteína PilC biológicamente activa fue eluida usando un tampón de citrato/fosfato (ácido cítrico 10 mM, Na_xH_xPO₄ 1 M, pH 3,5, 10 % de glicerina, NaCl 0,15 M). El material eluido se neutralizó inmediatamente usando una solución 1 M de Na₂HPO₄. La proteína PilC de esta invención contenida en el material eluido en forma pura se congela por choque en nitrógeno líquido y se almacena a -70 °C.

Ejemplo 4: Detección de un receptor para PilC en células epiteliales humanas

Se prepararon partículas MX Covashere fluorescentes (FMP) acopladas a pili como sigue: Las FMP (Duke Scientific Corporation, Palo Alto, California, EE.UU.) tienen una superficie que consiste en grupos activos que hacen posible un acoplamiento de proteínas directo y espontáneo. En general, 100 µl de las FMP que tienen un diámetro de 0,5 µm se mezclaron con aproximadamente 2 µg de pili purificados (de acuerdo con Jonsson et al., 1991) en 100 µl de PBS y se mezclaron en un disco de rotación durante 2 horas a temperatura ambiente. Las partículas recubiertas con pili se sedimentaron y se lavaron en 1 ml de tampón de bloqueo (20 mM TRIS.Cl con 2% de fetuína, pH 7,5), para bloquear los grupos de acoplamiento libres. La concentración de proteína en el sobrenadante después de la primera centrifugación se comparó con la cantidad de pili usada para determinar el rendimiento conseguido por el acoplamiento. Más del 80% de los pili utilizados se unió covalentemente a las FMP en esta reacción. Las partículas fueron sedimentadas de nuevo y se resuspendieron en 100 µl de PBS. Las FMP se recubrieron con pili purificados de una cepa de tipo silvestre adherente de Neisseria gonorrhoeae (FMP-pilina/PilC), y también se recubrieron con pili purificados de un mutante de delección PilC1/2 (MS11-N474: Facius et al, presentado para su publicación) (FMP-pilina) y con fetuína (FMP-fetuína; testigo negativo).

Para la detección de receptores específicos de la proteína PilC en células epiteliales humanas, se examinó la unión de las FMP recubiertas con pili a líneas de células epiteliales. Estos experimentos se llevaron a cabo con gonococos de acuerdo con el protocolo estándar de infección. Las células epiteliales fueron cultivadas en placas de cultivo de células de 24 pocillos sobre cubreobjetos estériles en medio RPMI con 5% de suero de ternera fetal (FCS) a 37 °C y bajo 5% de CO₂. Las monocapas de células epiteliales preconfluentes se lavaron con medio fresco antes de añadir 10 µl de la suspensión de FMP cargadas con pili por pocillo. La adherencia llevó 1 hr, durante la cual los cultivos se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Entonces se eliminaron las FMP no unidas lavando 5 veces con PBS y se fijaron utilizando paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 minutos. Los preparados se pudieron observar finalmente bajo un microscopio de fluorescencia Zeiss. Los resultados de esta prueba, que se exponen en la Tabla 1, muestran que al contrario que con los pili de tipo silvestre, los pili libres de PilC no median una unión a células epiteliales. La unión de pili libres de PilC a células epiteliales, sin embargo, puede complementarse añadiendo la proteína PilC2 biológicamente activa de esta invención. La adición de 2 µg de proteína PilC2 biológicamente activa en 100 µl de PBS a 100 µl de la FMP pilina ya recubierta fue seguida por incubación durante 2 horas a 20 °C bajo agitación constante. Las partículas se sedimentaron, se lavaron en 1 ml de PBS y se resuspendieron en 100 µl de PBS. La FMP pilina adicionalmente recubierta con proteína PilC se denomina FMP-(pilina + PilC).

Tabla 1: Unión de partículas fluorescentes a células epiteliales humanas

FMP	FMP por célula epitelial
FMP - fetuína	0,1 a 3
FMP - pilina / PilC	150 a 400
FMP - pilina	0,1 a 5
FMP - (pilina + PilC)	100 a 300

Unión de partículas fluorescentes (FMPs) a células epiteliales humanas. FMP fetuína, FMPs acopladas a fetuína; FMP-pilina/PilC, FMPs acopladas con pili purificados de la cepa de N. gonorrhoeae N137; FMP pilina, FMPs acopladas con pili purificados de las cepas de N. gonorrhoeae N474; FMP-(pilina + PilC), FMPs acopladas con pili purificados de la cepa de N. gonorrhoeae N474 que fueron incubadas adicionalmente con la proteína PilC de esta invención (Ejemplo 4). Los resultados de la unión se exponen en la cantidad media de FMPs por célula epitelial.

Ejemplo 5: Detección directa de la unión de PilC a los receptores en las células epiteliales humanas

Para la detección de receptores específicos de la proteína PilC en células epiteliales humanas, se examinó la unión de la proteína PilC biológicamente activa de esta invención a células ME180 (carcinoma de cuello uterino humano (ATCC HTB33)). Las células epiteliales se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂, en placas de 4 pocillos (4 Well Chamber Slides™; Nunc) en medio RPMI con 5% de suero de ternera fetal (FCS). La adición de aproximadamente 10 µg de proteína PilC biológicamente activa a un volumen máximo de 20 µl fue seguida por incubación durante 30 minutos a 37 °C y 5% de CO₂. Cada pocillo se lavó tres veces con 1 ml de PBS, después las células epiteliales y la proteína PilC unida se inmovilizaron durante 30 minutos en paraformaldehído al 2% en PBS. Para hacer visible la proteína PilC unida, se llevó a cabo tinción de inmunofluorescencia usando antisueros específicos contra la proteína PilC biológicamente activa de esta invención. Estos antisueros fueron obtenidos mediante la inmunización de ratones Balb/c usando la proteína PilC biológicamente activa de esta invención. Los preparados fijados se lavaron dos veces usando 1 ml de PBS y se incubaron con una dilución de 1:300 de los antisueros en PBS durante 1 hr. El resultado se lavó cinco veces con PBS, 0,05% de Tween 20 con el fin de eliminar los anticuerpos unidos no específicamente (ab). Para hacer visible el complejo PilC ab, la incubación se llevó a cabo durante 60 minutos a 20 °C utilizando un segundo ab dirigido contra inmunoglobulinas murinas y marcado con el colorante fluorescente FITC, en una dilución de 1:2000 en PBS con 0,025% de Tween 20. De nuevo, la sustancia resultante se lavó minuciosamente (5 veces) con PBS, 0,05% de Tween 20, antes de cubrir los preparados y se analizaron usando un microscopio de fluorescencia Zeiss. Los testigos negativos fueron (a) células epiteliales sin PilC con segundo ab; (b) células epiteliales sin PilC con primer ab y con segundo ab, y (c) células epiteliales con PilC y segundo ab. Aunque las células epiteliales preincubadas con la proteína PilC biológicamente activa de esta invención fueron altamente fluorescentes después de la tinción con antisueros específicos para PilC, no fueron más que ligeramente fluorescentes en todos los experimentos testigo o de control. Con el fin de tener un control adicional, el experimento se llevó a cabo con células MDCK a las que no se unen *Neisseria* piliadas; en correspondencia, no pudo detectarse ninguna unión de la proteína PilC de esta invención.

Ejemplo 6: Competencia de la infección de las células epiteliales con *Neisseria*

La realización de la infección *in vitro* y/o de los experimentos de inhibición tiene lugar con células ME180 preconfluentes [carcinoma de cuello uterino humano (ATCC HTB33)] que se cultivaron en cubreobjetos en una placa de cultivo de células de 24 pocillos. Para la inhibición de la adhesión mediada por pilus de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y 5% de CO₂ en 500 µl de medio RPMI, FCS al 5%, mediante la adición de 20 µg de la proteína PilC biológicamente activa. Para la infección, las bacterias se cultivaron durante la noche a 37 °C, 5% de CO₂ en una placa de GC, y luego fueron resuspendidas en 1 ml de medio RPMI, FCS al 5% utilizando una torunda de algodón. La determinación de la densidad de bacterias se llevó a cabo utilizando el espectrofotómetro. Las aproximadamente 2x10⁵ células epiteliales preconfluentes se infectaron con 7x10⁷ bacterias y se incubaron durante 1 hr a 37 °C, 5% de CO₂. La detención de la infección tiene lugar lavando cinco veces con PBS precalentado, y a continuación fijando las células con paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 minutos. Las células fijadas se tiñeron después durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente usando violeta cristal (0,07% p/v) y las bacterias adherentes se determinaron por ME 180. Como se puede observar en la Tabla 2, todas las cepas de *Neisseria* piliadas ensayadas se adhirieron cuando no estaba presente la proteína PilC2 biológicamente activa, mientras que la cepa de *N. gonorrhoeae* no piliada no se adhirió. En presencia de la proteína PilC2 biológicamente activa la unión de las cepas de *Neisseria* piliadas ensayadas se redujo al nivel de base. Así pues, la reducción de la unión a células epiteliales tuvo lugar al margen de la variante de la proteína PilC formada naturalmente por la bacteria (PilC1 en TRN289, en comparación con PilC2 en TRN290, en comparación con una proteína PilC desconocida en *N. meningitidis* N530). Esto sirve para (i) demostrar que la proteína PilC es una importante adhesina bacteriana (es decir, es esencial para la aparición de una infección), (ii) confirmar la baja variabilidad de diferentes proteínas PilC relativas al reconocimiento de receptores celulares, y por tanto (iii) demostrar la adecuación de los inhibidores de esta invención para inhibir la interacción entre la proteína PilC y sus receptores celulares.

Tabla 2: Competencia de la unión de *Neisseria* a células epiteliales humanas

Cepas de <i>Neisseria</i>	Neisseria por célula epitelial	
	pretratamiento de las células epiteliales	
	sin PilC	20 µg/ml de PilC
N137	165	-
N174	-	-
TRN289 (pilE _{N137} ; PilC1)	140	-
TRN290 (pilE _{N137} ; PilC2)	155	-
N530	103	-

Competencia de la unión de *Neisseria* patógena a células epiteliales humanas. N137, cepa de *N. gonorrhoeae* no piliada MS11; N174, cepa no piliada derivada de *N. gonorrhoeae* MS11 en el que se ha borrado el gen *pilE*; TRN289, cepa *N. gonorrhoeae* piliada MS11 que forma exclusivamente PilC1; TRN290, cepa de *N. gonorrhoeae* piliada MS11 que forma exclusivamente PilC2, y N530; cepa *N. meningitidis* que forma una proteína PilC desconocida. El pretratamiento de las células epiteliales con 20 µg / ml de proteína PilC2 de esta invención se describe en el Ejemplo 6. Los resultados del experimento de competencia se exponen en el número medio de bacterias adherentes por célula epitelial.

Ejemplo 7: Identificación de otras secuencias de DNA que codifican proteína PilC

Para la determinación de la secuencia de DNA del gen *PilC2*, se clonó el fragmento BamHI/EcoRI de pTR27 en el vector bluescript SK (pTR34). Por medio de la exonucleasa III se generaron y se secuenciaron clones de delección de pTR34 solapantes adecuados. La comparación de las secuencias de DNA que codifican la PilC1 (A. Jonsson, Umea University, New Series No. 322, Departamento de Microbiología, ISSN 0346-6.612) y de las que codifican la proteína PilC2 (Figura 4) usando el programa informático PCGENE/ALGIN, indicó un 84% de identidad. Las porciones de las secuencias idénticas se extendieron en forma de isla sobre ambos genes con una clara concentración en el término 3'. Con el fin de identificar más secuencias que codifican proteínas PilC, se construyeron sondas de oligonucleótidos para las secuencias idénticas entre PilC1 y PilC2. En la construcción de las sondas de oligonucleótidos, se tuvo un especial cuidado de tomar turnos en la deducción de los oligonucleótidos de las cadenas (+) y (-) de DNA con el fin de poder amplificar los fragmentos correspondientes por medio de PCR cuando fuese necesario. De esta manera, la secuencia completa de DNA de los genes *PilC1* *PilC2* y se dividió en fragmentos solapantes de aproximadamente 400 a 500 bp. Además, a cada oligonucleótido de la cadena (+) se añadió la secuencia de hibridación de cebador "M13mp" en el terminal 5', a cada oligonucleótido de la cadena (-) se añadió la secuencia de hibridación de cebador "M13mp inverso" (Vieira y Messing, Gene 19, 259-268, 1982) en el extremo 5' para poder identificar directamente la secuencia de DNA del fragmento de PCR.

Una selección de sondas de oligonucleótidos se marcaron con biotina según las instrucciones del kit de adición de colas de oligonucleótidos DIG (Boehringer Mannheim) y se utilizó para hibridación frente a DNA cromosómico de *N. gonorrhoeae* segmentado con ClaI y PvuII. La transferencia Southern usando las sondas de oligonucleótidos antes mencionadas (Tabla 3) indicó inequívocamente la existencia de más genes PilC (además de *PilC1* y *PilC2*) en la cepa de *N. gonorrhoeae* MS11 y en la cepa de *N. meningitidis* A1493. Además, se detectaron genes para las proteínas análogas a PilC en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* usando estas sondas. Los genes así identificados pueden ser ahora clonados, caracterizados y procesados más intensamente usando técnicas estándar. Este experimento demostró que el método descrito es adecuado para la identificación de genes anteriormente desconocidos para proteínas análogas PilC y/o PilC.

Tabla 3: Sondas de oligonucleótidos para la identificación de otras secuencias de nucleótidos que codifican proteínas PilC

Oligonucleótido	Posición 5' pilC1/pilC2	Secuencia	cadena DNA +/-
TR47	117 / 117	TATTATCATGAACGAGCG	+
TR48	392 / 413	CGGGTGGTACGAATCCAA	-
TR49	322 / 343	AAGGTTTCGGTTTTGATG	+
TR50	692 / 713	ACGATGGTTTGATTATTA	-
TR51	590 / 611	GCGTATCTTCAATTGG	+
TR52	1033 / 1060	ACCACAGCGCGGGGCGGTCAG	-
TR53	935 / 965	AGTCAAAGCAGGCGGCTG	+
TR54	1411 / 1423	COGTCCAAGGCAGCAGCAC	-
TR55	1327 / 1339	AAAAACGACACTTTCGGC	+
TR56	1757 / 1799	TCCACGCCGTAGCGGTCG	-
TR57	1630 / 1672	AATCTGAAGCTCAGCTAC	+
TR58	2015 / 2072	AGGAAGGCGCGTATTG	-
TR59	1957 / 2016	TACACCGTCCGTACGCCGC	+
TR60	2329 / 2386	CTGCCAGTCCGGAAACGGC	-
TR61	2253 / 2311	TAGTAAATGGTCTGCAAAG	+
TR62	2611 / 2674	TACGCAATACCACGGTCG	-
TR63	2563 / 2626	TTGAGGGAAGGAGAACGGC	+
TR64	2878 / 2941	CCAG(G/A)TAACGCACATTAACC	-
TR65	2823 / 2886	AACCGTCTGCCCGAACGG	+
TR66		TTCCGACGGCATTTCGGG	-

35

Ejemplos de sondas de oligonucleótidos para la identificación de otras secuencias de nucleótidos que codifican proteínas PilC. Los ejemplos TR47-TR65 se tomaron de la comparación de secuencias de los genes de *N. gonorrhoeae* PilC1 y PilC2 en la Figura 4A. TR66 corresponde a una secuencia aguas abajo de la porción de codificación de los genes PilC. Los números de posición se refieren a los genes PilC1 y/o PilC2 en la Figura 4A.

5

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de una proteína esencialmente pura que tiene la actividad biológica de la proteína PilC, en el que la actividad significa que la proteína apoya el ensamblaje de los Pili de tipo 4, media la unión de las bacterias que llevan pili de tipo 4 a los receptores en células epiteliales humanas o muestra adecuación inmunológica para inducir anticuerpos contra bacterias que llevan pili de tipo 4 que compiten con la unión de las bacterias a sus receptores en las células epiteliales humanas y preferiblemente bloquean la unión obtenible según un método en el que se cultiva una célula hospedadora bajo condiciones adecuadas con un vector recombinante que contiene una secuencia génica recombinante para la síntesis de la proteína, como se muestra en la Figura 4, cuya porción de secuencia de fase variable que codifica el péptido señal y que contiene una secuencia de nucleótidos homopolimérica se caracteriza por la siguiente modificación:
- 5
- 10
- (a) sustitución de la porción de secuencia de fase variable que codifica el péptido señal por una secuencia de nucleótidos heteropolimérica, no de fase variable, que comprende CATAACGGTGGAGGTGGTGGAGCG, que codifica un péptido señal que es compatible con la secreción de la proteína PilC,
- 15
- de forma que se hace posible la expresión de la secuencia genética recombinante en una célula hospedadora no afectada por variaciones de fase, y se purifica la proteína.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la secuencia genética se puede obtener por modificación de una secuencia de DNA derivada de una bacteria patógena que lleva pili de tipo 4.
3. El método según la reivindicación 2, en el que la bacteria patógena es una bacteria del género *Neisseria*, preferiblemente *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria meningitidis*.
- 20
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de nucleótidos homopolimérica modificada para formar una secuencia de nucleótidos heteropolimérica comprende al menos 5 nucleótidos.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia génica codifica además una porción de oligohistidina adecuada para su purificación.
- 25
6. El método según la reivindicación 5, en el que la porción de oligohistidina codificada está localizada en el término N o en el término C de la forma madura de la proteína codificada.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la secuencia génica en el vector recombinante está bajo el control de un promotor.
- 30
8. El método según la reivindicación 7, en el que el promotor es un promotor activo en células hospedadoras de *Neisseria*.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la célula hospedadora es una cepa de *Neisseria* no piliada.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la purificación comprende cromatografía de afinidad.
- 35
11. El método para la producción de una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que posee un marcaje detectable.

Figura 1: Mapas de restricción de los plásmidos pTR27 y pIS26

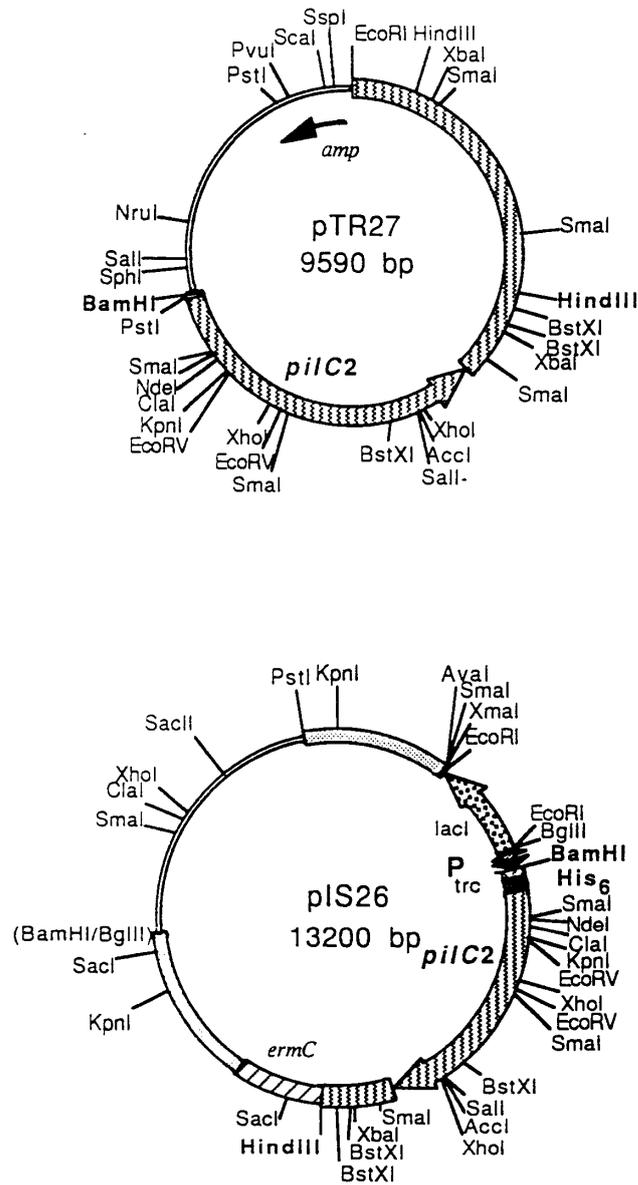
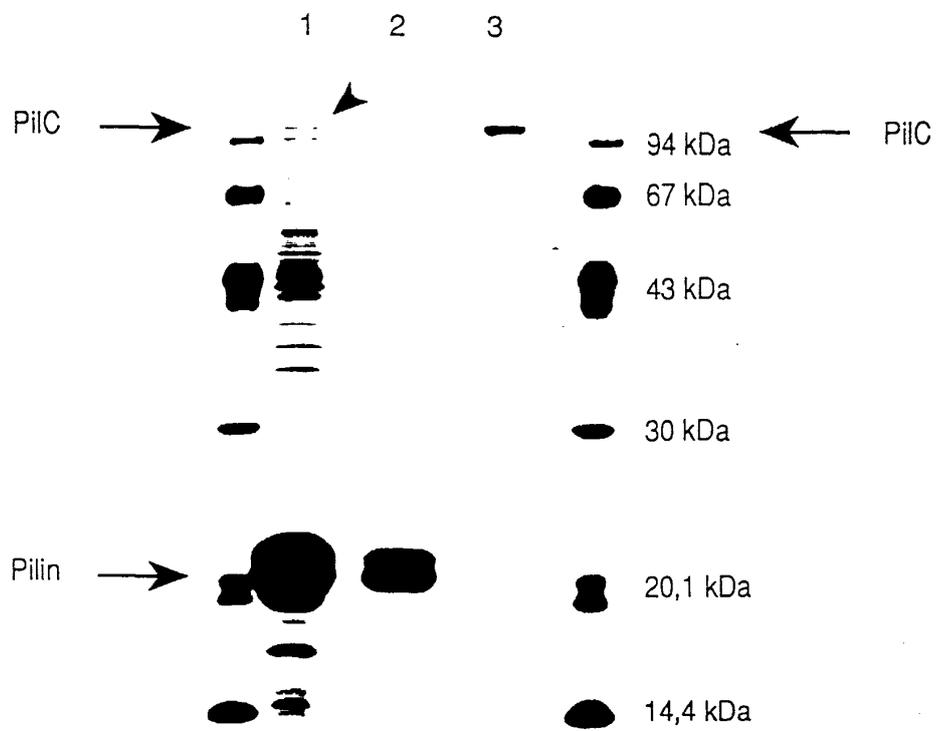


Figura 3: Electroforesis en gel analítica de pili purificados y proteína PilC



ES 2 402 413 T3

PILC1MS11 - ACAAAGACGGTAAAACCGTCTGCCCGAACGGATATGTTTACGACAAGCCG -2858
 ||| || | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 PILC2MS11 - GGAAAAACAGCAAAAACCGTCTGCCCGAACGGATATGTTTACGACAAAACCG -2922
 PILC1MS11 - GTTAATGTGCGTTATCTGGATGAAACGGAAACAGACGGATTTTCAACGAC -2908
 ||||||||||||||| ||||| ||||| ||||||||||| || | ||
 PILC2MS11 - GTTAATGTGCGTTACCTGGACGAAAAGAAAACAGACGATTTCCCCGTCAC -2972
 PILC1MS11 - GGCGGACGGCGATGCGGGCGGCAGCGGTATAGACCCCGCCGGCAGGCGTC -2958
 ||| ||||| ||||| ||||||||||||| | | | | | || | |
 PILC2MS11 - GGCAGACGGTGATGCAGGCGGCAGCGGAACATTCAAAGAGGGTAAAAAAC -3022
 PILC1MS11 - CCGGCAAAAACAACCGCTGCTTCTCCAAAAAGGGGTGCGCACCCCTGCTG -3008
 ||| | || ||||| ||||||||| ||||| |||||||||||||||
 PILC2MS11 - CCGCCCGCAATAACCGGTGCTTCTCCGAAAAGGTGTGCGCACCCCTGCTG -3072
 PILC1MS11 - ATGAACGATTTGGACAGCTTGGATATTACCGGCCCGATGTGCGGTATCAA -3058
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 PILC2MS11 - ATGAACGATTTGGACAGCTTGGATATTACCGGCCCGATGTGCGGTATCAA -3122
 PILC1MS11 - ACGCTTAAGCTGGCGCGAAGTCTTCTTCTGA -3089
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||
 PILC2MS11 - ACGCTTAAGCTGGCGCGAAGTCTTCTTCTGA -3153

C

PILC2MS11 - ATGAATAAACTTTAAAAAGGCGGGTTTTCCGCCATACCGCGCTTTATGC -50
 |||
 PILCA1493 - ATGAATAAACTTTAAAAAGGCGGGTTTTCCGCCATACCGCGCTTTATGC -50
 |||
 PILC2MS11 - CGCCATCTTGATGTTTTCCCATACCGGCGGGGGGGGGGGGGCGCAGGCGC -100
 |||
 PILCA1493 - CGCCATCTTGATGTTTTCCCATACCGGCGGGGGGGGGG---CGATGGCGC -96
 |||
 PILC2MS11 - AAACCCGTAAATACGCTATTATCATGAACGAGCGAAAGCAGCCGAGGTA -150
 |||
 PILCA1493 - AAACCCATAAATACGCTATTATCATGAACGAGCGAAACCAGCTCGAGGTA -146
 |||
 PILC2MS11 - AAGTGGGAGGGTCAATATAGTCAATCAACATTAAGGACAAAGGCAGGGA -200
 |||
 PILCA1493 - AAGGGGAATGGGCAATAT-----TCAACAATAAAGGACAAAGACAGGGA -190
 |||
 PILC2MS11 - GCGGACATTTAGCCATACGAGCCAGAGAAACTGGAACGGCCAACAAAACA -250
 |||
 PILCA1493 - ACGCAAATTTATCTATAATAAAGACAGAGGGGGTGGAGGC----- -230
 |||
 PILC2MS11 - ATTTTATCTCATTCAACAATAGCGATGAGCTTGTTCCTCCGACAAAGCGGT -300
 |||
 PILCA1493 - --TCTGINTTTTTCGACAATACCGATACCCTTGTTCCTCAACAAAGAGGT -278
 |||
 PILC2MS11 - ACTGCCGTTTTTGGCACAGCCACCTACCTGCCGCCCTACGGCAAGGTTTC -350
 |||
 PILCA1493 - ACTGCCGTTTTTGGCACAGCCACCTACCTGCCGCCCTACGGCAAGGTTTC -328
 |||
 PILC2MS11 - CGGTTTTGATGCCGACGGGCTGAAAAGCGCGGCAATGCCGTGAATTGGA -400
 |||
 PILCA1493 - CGGTTTTTRATGCCGACGGGCTGAAAAGCGCAACAATGCCGTGATGGA -378
 |||
 PILC2MS11 - TTCGTACCACCCGGCCCCGGGCTGGCAGGCTACATCTACACCGGCGTCATA -450
 |||
 PILCA1493 - TTCATACCACCCAGGCCGGGCTGGCAGGCTACGCTACACCGACGTCATA -428
 |||
 PILC2MS11 - TGCAGAGACACAGGGCAATGCCCCGAAC TTGTCTATGAGACCAAATTTTC -500
 |||
 PILCA1493 - TGCAGAAGCAA---CCAATGCCCCCAACTTGTCTATGAGACCAAATTTTC -475
 |||
 PILC2MS11 - CTTCGACGGCATCGATTTGGCAAAAGGGGAAACCGAAAGCTGGATAGGC -550
 |||
 PILCA1493 - CTTCGACGGCATCGGTTTGGCAAAAATGCGGGCAGC---CTGGATAGGC -522
 |||
 PILC2MS11 - ACCCGGACCCAAGCCGCGAAAATTTGCCCATTTACAAATTGAAGGATCAT -600
 |||
 PILCA1493 - ACCCGGACCCAAGCCGCGAAAATTCGCSCATTTACAAATTGAAGGATCAT -572
 |||
 PILC2MS11 - CCATGGTTGGGCGTATCTTTCAATTTGGGCGGCGAGGGTACCGCCAAAGA -650
 |||
 PILCA1493 - CCATGGTTGGGCGTATCTTTCAATTTGGGCGAGGAGAAATACCGTCAAAGA -622
 |||
 PILC2MS11 - TGGCAGATCATCCAGCAGATGGATATCTTCTTTTAGTGAAGACAATAATA -700
 |||
 PILCA1493 - TGGCAAATCATTCAACAATTTGATATCTTCTTTTAGTGAAGCAATAATA -672
 |||

ES 2 402 413 T3

PILC2MS11 - ATCAAACCATCGTCTTTACGACACGAGGCCACCCTATTTCCCTTGCGCAG -750
 |||
 PILCA1493 - ATCAAACCATCGTCTCTACGACACGAGGCCACTCTATTTCCCTTAGCGCAG -722
 |||
 PILC2MS11 - TGGCAGCGCGAAAGTACCGCCATGGCCTATTATCTGGACGCCAAACTGCA -800
 |||
 PILCA1493 - TGAAGCGCGAACATAACCGCCATGGCCTATTATCTGAACGCCAAACTGCA -772
 |||
 PILC2MS11 - CCTGCTGGATAAAAACACAGATTGAAAATATCGCGCCAGGCAAACAGTGA -850
 |||
 PILCA1493 - CCTGCTGGACAAAAAGGGATTGAAGATATCGCCCAAGGCAAACAGTGG -822
 |||
 PILC2MS11 - ATTTGGGCATCTTGAGACCGCGCGTCGAGGCAAAGGTAAGGCGGAAGTGG -900
 |||
 PILCA1493 - ATTTGGGCACCTTGAGACCGCGCGTCGAGGCAACGGTAAGGCGGG---GG -869
 |||
 PILC2MS11 - GATCTGCTAAATTTTGGGCTAAGTGGGACATTAAAGATACCGGGCAGAT -950
 |||
 PILCA1493 - GAGCTGCTAAATTTTGGGCTACGTGGAAGATTGAAGATAAAGGGAACAT -919
 |||
 PILC2MS11 - TCCGGTCAAGCTCGGCC-TGCCGGAAGTCAAAGCAGGCCGCTGCAT-CAA -998
 |||
 PILCA1493 - TACAGTNCGCCTNNGCCCTGCCGGAAGTCAAAGCAAGNCGGTTTCGTACAA -969
 |||
 PILC2MS11 - CAAACCGAACCCCAATCCCAAATC---AGCCCTTTCGCCGGCCTGACCG -1045
 |||
 PILCA1493 - CAAAGCGAACCCCAATCCCAACGCCAAAGCCCCCCTCCCCGCACTGACCG -1019
 |||
 PILC2MS11 - CCCCCGCGCTGTGGTTTCGGCCCTGTGCAAAATGGCAAGGTGCAGATGTAT -1095
 |||
 PILCA1493 - CCCCCGCGCTGTGGTTTCGGACCTGTGAAAGATGGTAAGGCGGAGATGTAT -1069
 |||
 PILC2MS11 - TCCGCTTCGGTTTCCACCTACCCCGGCAGCTCGAGCAGCCGCATCTTCCT -1145
 |||
 PILCA1493 - TCCGCTTCGGTTTCTACCTACCCCGACAGTTCGAGCAGCCGCATCTACCT -1119
 |||
 PILC2MS11 - CCAAGAGCTGAAAACCTAAAACCGACCCCGCCGCGCCGGCCGGCATTCCC -1195
 |||
 PILCA1493 - TCAAAATCTGAAAAGAAAACCGACCCCGGCAAACCCGGCCGCCATTCCC -1169
 |||
 PILC2MS11 - TCGCCGCTTTGAATGCGCAGGATATCAAATCCCGCGAGCCGAATTTCAAC -1245
 |||
 PILCA1493 - TCGAAACCTTGACTGAGAATGATATTTAAAAGTCGAGAGCCGAATTTTACA -1219
 |||
 PILC2MS11 - TCAAGGCAGACCGTCATCCGATTGCCGGCGGCGTGTACCAGATCGCCCC -1295
 |||
 PILCA1493 - GGGCGGCAAACCATCATCCGATTGAATGGCGGCGTACGTGAGATCAAACCT -1269
 |||
 PILC2MS11 - GG---GCAATAGCGGCCGGGTCGCGGGTTTTTAATGGCAATGACGGCAAAA -1342
 |||
 PILCA1493 - GGATAGAAACAATACTGAGGTCGTCAATTTTTAATGGAAATGACGGCAACA -1319
 |||
 PILC2MS11 - ACGACACTTTCGGCATCTACAAGGACAGGCTCGTCACACCTGAGGTTCGGC -1392
 |||
 PILCA1493 - ACGACACTTTCGGCATTGTTAAGGACTTGGGCGTCAACCTGATACCAGC -1369
 |||
 PILC2MS11 - GAGTGGAGCGAAGTGCTGCTGCCTTGGACGGCCCGGTATTACGGTAATGA -1442
 |||
 PILCA1493 - GAGTGGAAAAAAGTATTGCTGCCTTGGACGGTTCGGGGTTTTGCTGATGA -1419
 |||

