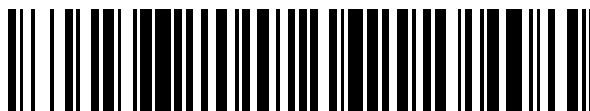


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 316**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/18**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2011** **E 11710752 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014** **EP 2550366**

54 Título: **Procedimientos de identificación de inhibidores del sistema de secreción de tipo III**

30 Prioridad:

**23.03.2010 EP 10157397**

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

**09.01.2015**

73 Titular/es:

**IMBA-INSTITUT FÜR MOLEKULARE  
BIOTECHNOLOGIE GMBH (100.0%)**

**Dr. Bohrgasse 3  
1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**MARLOVITS, THOMAS C.;  
RADICS, JULIA y  
SCHMIED, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 526 316 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

Procedimientos de identificación de inhibidores del sistema de secreción de tipo III

La presente invención se refiere a procedimientos de identificación de agentes antibacterianos que se dirigen al sistema de secreción de tipo III (T3SS).

Aunque los antibióticos se encuentran entre los fármacos más eficaces, están asociados con graves problemas, por ejemplo, su falta de especificidad por las bacterias patógenas, afectando así a la flora bacteriana normal, lo cual provoca la aparición de bacterias resistentes. En la búsqueda de fármacos antibacterianos alternativos, el T3SS ha surgido como una diana terapéutica prometedora para el desarrollo de nuevos productos terapéuticos, debido a que es un mecanismo clave de la virulencia que está muy conservado y es absolutamente necesario para la virulencia de muchos patógenos bacterianos Gram-negativos, lo cual hace que el T3SS sea una diana atractiva.

Los sistemas de secreción de tipo III son máquinas moleculares que son fundamentales para la virulencia de importantes patógenos bacterianos, ya que transportan las toxinas bacterianas ("efectores" o "proteínas efectoras") hacia las células hospedantes, que incluyen *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritica*, todas las demás especies de *Salmonella*, *Shigella* spp. (que incluye *S. flexneri* y *S. dysenteriae*), *Yersinia* spp. (*Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*), cepas enteropatógenas de *E. coli* (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Vibrio cholerae*, *Hafnia alvei*, *Bordetella* sp. y especies de *Chlamydia*. Además, la vía de secreción conservada es necesaria para provocar la enfermedad en patógenos animales, tales como *E. coli* de conejo (RDEC-1), y *Citrobacter rodentium*. También es crítica para la producción de la enfermedad en varios patógenos vegetales importantes. Varios patógenos Gram-negativos que provocan daños importantes desde el punto de vista económico en cultivos vegetales utilizan el sistema de secreción de tipo III, al igual que los patógenos humanos. Los patógenos vegetales incluyen *Pseudomonas syringe*, *P. solanacearum*, y *Xanthomonas campestris*.

Los efectores secretados tienen la capacidad de modular diversas funciones de la célula eucariota, que puede ser una célula de mamífero o una célula vegetal, que incluyen la dinámica del citoesqueleto, el tráfico de vesículas, el avance del ciclo celular y la transcripción. Una infección provoca síntomas clínicos que varían de cefaleas suaves y diarrea a enfermedades que pueden ser mortales, tales como la fiebre tifoidea o la peste bubónica. En el centro del T3SS se encuentra el complejo de la aguja, que está incrustado dentro de la membrana bacteriana interna y externa, abarca el espacio periplásmico y se extiende hacia el entorno extracelular con un filamento similar a una aguja. El complejo de la aguja con forma cilíndrica ("inyectisoma") está compuesto por proteínas estructurales que forman una base de múltiples anillos asociada con la envuelta bacteriana, y una extensión similar a una aguja que sobresale varios nanómetros desde la superficie bacteriana. La aguja está anclada a la base a través de otra subestructura, la varilla interna, que junto con el filamento de la aguja forma un canal que actúa como conducto para las proteínas efectoras que viajan a través de esta vía de secreción (Marlovits et al., 2004, Science, 306, 1040-1042). El ensamblaje del complejo de la aguja se produce en etapas discretas que primero conducen al ensamblaje de la subestructura de la base.

El ensamblaje y el funcionamiento del inyectisoma implica a pequeñas chaperonas (12-18 kDa) que permanecen en el citosol bacteriano (véase, por ejemplo, Ghosh, 2004, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 68:771-795). Aunque algunas de estas chaperonas están implicadas en el ensamblaje del inyectisoma (clase III) o el poro de translocación (clase II), otras están subordinadas a los efectores. Este último grupo de chaperonas se clasifica como chaperonas de clase I (Letzelter et al., 2006, The EMBO Journal (2006), 25, 3223-3233), y también se denomina "chaperonas de clase 1A". Estas chaperonas habitualmente se unen a un efector, y la mayoría son codificadas por genes localizados adyacentes al gen que codifica los efectores cognados. Son proteínas ácidas (pI: 4-5), habitualmente diméricas, que se unen a su efector cognado en sus primeros 100 aminoácidos, justo cadena abajo de la señal de secreción N-terminal corta. A menudo, pero no siempre, son codificadas al lado del gen que codifica su proteína efectora compañera. Aunque su similitud de secuencia es baja, su estructura está bastante bien conservada. Antes de su translocación hacia las células hospedantes, las chaperonas son retiradas de sus efectores por la ATPasa que es parte del inyectisoma (Akeda y Galan, 2005, Nature, 437:911-915).

Los procedimientos indicados de identificación de inhibidores de T3SS principalmente se centran en la secreción de las proteínas efectoras y se basan en sistemas indicadores: el documento WO2009/145829 describe un procedimiento de selección de alta capacidad de procesamiento basado en una proteína indicadora recombinante ( $\beta$ -lactamasa), cuya secreción depende del sistema de secreción de proteínas de tipo III, en el que un cambio en la cantidad de proteína indicadora que se segrega hacia fuera de la célula hospedante bacteriana recombinante es indicativo de un efecto inhibidor o activador de un compuesto de ensayo sobre el T3SS.

El documento WO2009/137133 describe un procedimiento que comprende, como una etapa de selección primaria, un ensayo indicador similar, en el que el compuesto se ensaya para la inhibición de la secreción, y tras esta

selección primaria se realizan ensayos secundarios para eliminar los inhibidores no específicos. En el ensayo secundario, el compuesto se ensaya para la regulación transcripcional de una proteína de T3SS y/o la expresión de un componente estructural del T3SS.

El procedimiento de selección para identificar compuestos que afectan a la secreción de tipo III se describe en el documento WO2009/061491, que implica ensayar para moléculas inhibidoras que afectan a la denominada “respuesta de calcio bajo” en bacterias que tienen un sistema de secreción de tipo III. El ensayo de selección primario se basa en la medición del crecimiento bacteriano, opcionalmente empleando un sistema indicador. Un ensayo de confirmación secundario mide el efecto de un compuesto de ensayo sobre el nivel de las proteínas segregadas, es decir, las proteínas efectoras, que, en el caso de *Yersinia*, se conocen como YOP (proteínas externas de *Yersinia*).

Gauthier et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, octubre 2005, 4101-4109, describen un ensayo de alta capacidad de procesamiento basado en ELISA para controlar el efecto de compuestos de ensayo sobre la proteína efectora EspB de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), un patógeno humano responsable de brotes de diarrea.

Veenendal et al., J. Bact., 191(2), 2009:563-570, se refiere a salicilidenacilhidrazidas como inhibidores potenciales del complejo de la aguja de T3SS y a métodos para detectar complejos de la aguja de diferentes longitudes.

Sani et al., Biochem. Bioph. Acta, 1770(2), 2007:307-311 describen características de densidad en la punta del complejo de la aguja debido a entrecruzamientos.

Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos procedimientos para determinar si un compuesto de ensayo afecta a la función del T3SS y, con ello, a la virulencia de una bacteria que depende del T3SS. En particular, los nuevos procedimientos deberían proporcionar un ensayo muy sensible para identificar compuestos que son muy específicos, ya que afectan a la función del complejo de la aguja, es decir, interfieren con el ensamblaje de sus componentes estructurales.

Así, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de inhibir la función del sistema de secreción de tipo 3 T3SS, en el que un compuesto de ensayo se pone en contacto con células bacterianas que tiene un T3SS, y se ensaya:

a. en una primera etapa, su capacidad para inhibir la secreción de una proteína efectora en dichas células bacterianas determinando la cantidad de una proteína efectora secretada debido a su unión a su molécula de chaperona cognada, en el que una cantidad reducida de proteína efectora unida a dicha chaperona, comparada con la cantidad en una muestra control procedente de células que no han sido tratadas con dicho compuesto de ensayo, es indicativa de un efecto inhibidor de dicho compuesto sobre la secreción de dicha proteína efectora, y

b. en una segunda etapa, su capacidad para inhibir el ensamblaje de los componentes estructurales para formar el complejo de la aguja de T3SS.

En dicha primera etapa, la cantidad de efector o translocador secretado (los “translocadores” o “proteínas translocadoras” son proteínas que ayudan a los efectores a atravesar la membrana de células eucariotas) puede determinarse directamente, por ejemplo, a escala de laboratorio, mediante una electroforesis seguida de la tinción de las proteínas. La cantidad de proteínas secretadas de tipo III en el sobrenadante también puede detectarse mediante un procedimiento inmunológico empleando anticuerpos dirigidos a una o más de las proteínas secretadas. Los procedimientos adecuados incluyen, pero no se limitan a transferencia Western, transferencia de inmunomanchas y ELISA. Preferiblemente, el ensayo de dicha primera etapa es un ELISA. El anticuerpo añadido al efector inmovilizado puede estar marcado directamente, o puede detectarse de modo indirecto mediante la adición, después de lavar el exceso del primer anticuerpo, de un exceso molar de un segundo anticuerpo marcado dirigido contra la IgG de la especie animal del primer anticuerpo.

Un ensayo ELISA convencional habitualmente se realiza según protocolos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, como sigue: La muestra que se va a ensayar, por ejemplo, el lisado bacteriano, se pone en contacto y se incuba con el reactivo de captura (o revestimiento) inmovilizado. La inmovilización normalmente se logra insolubilizando los reactivos de captura antes del procedimiento de ensayo, por ejemplo, mediante adsorción a una superficie o matriz hidrofóbica. La fase sólida empleada para la inmovilización puede ser cualquier soporte o vehículo inerte que sea fundamentalmente hidrofóbico y que sea útil en ensayos inmunométricos, que incluyen soportes en forma, por ejemplo, de superficies, partículas, esferas, matrices porosas, etc. Los ejemplos de soportes que se emplean habitualmente incluyen láminas pequeñas, Sephadex, poli(cloruro de vinilo), esferas de plástico, y placas de ensayo o tubos de ensayo fabricados con polietileno, polipropileno, poliestireno y similares, que incluyen placas de microtitulación de 96 pocillos, así como materiales en partículas, tales como papel de filtro, agarosa, dextrano reticulado y otros polisacáridos. Como alternativa, pueden emplearse matrices hidrofóbicas reactivas, tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno, y los sustratos reactivos se emplean de

forma adecuada para la inmovilización del reactivo de captura. En una realización preferida, los reactivos de captura inmovilizados están revestidos sobre una placa de microtitulación y, en particular, la fase sólida preferida empleada es una placa de microtitulación de múltiples pocillos que puede utilizarse para analizar varias muestras al mismo tiempo.

5 La fase sólida está revestida con el reactivo de captura, que puede estar unido al soporte sólido mediante una interacción covalente o no covalente o mediante un enlace físico. Las técnicas para la unión son muy conocidas en la técnica. Si es covalente, la placa u otra fase sólida se incuban con un agente reticulante junto con el reactivo de captura bajo condiciones muy conocidas en la técnica, tales como durante 1 hora a temperatura ambiente.

10 Las placas revestidas generalmente se tratan con un agente bloqueante que se une de forma no específica a los sitios de unión y los satura para evitar la unión no deseada al exceso de sitios sobre los pocillos de la placa. Los ejemplos de agentes bloqueantes adecuados incluyen, por ejemplo, gelatina, albúmina de suero bovina, albúmina de huevo, caseína y leche desnatada.

15 Después del revestimiento y del bloqueo, la muestra se añade a la fase inmovilizada. Para una sensibilidad suficiente, la cantidad de muestra añadida debe ser tal que los reactivos de captura inmovilizados se encuentren en un exceso molar de la concentración molar máxima del efector libre previsto en la muestra. Las condiciones para la incubación de la muestra y el reactivo de captura inmovilizado se seleccionan para maximizar la sensibilidad del ensayo y minimizar la disociación. Después, la muestra se retira (preferiblemente lavando con un "tampón de lavado") para eliminar el efector no capturado.

20 También puede añadirse un agente reticulante u otro agente adecuado en esta etapa para permitir que el efector unido se una covalentemente a los reactivos de captura, en caso de que exista la preocupación de que el efector capturado pueda disociarse en algún grado en las posteriores etapas.

25 Después, el efector inmovilizado se pone en contacto con un anticuerpo, que puede detectarse de modo directo o indirecto. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. El anticuerpo puede ser directamente detectable, por ejemplo, porta un marcador fluorimétrico. El marcador fluorimétrico tiene más sensibilidad que el marcador colorimétrico. El anticuerpo detectable puede biotinarse, y el medio de detección puede ser avidina o estreptavidina-beta-galactosidasa y MUG (4-metilumbeliferil-beta-galactosidasa).

Preferiblemente, se añade a la placa un exceso molar de un anticuerpo con respecto a la concentración máxima esperada de efector libre, después de haberla lavado. La afinidad del anticuerpo debe ser lo suficientemente alta como para que puedan detectarse pequeñas cantidades del efector libre.

30 Después, se mide la cantidad de efecto que se ha unido al reactivo de captura detectando el anticuerpo unido al efector. Para este fin, el anticuerpo puede estar marcado directamente o ser detectado de modo indirecto mediante la adición, después de lavar el exceso del primer anticuerpo, de un exceso molar de un segundo anticuerpo marcado dirigido contra la IgG de la especie animal del primer anticuerpo. En este último ensayo indirecto, los antisueros marcados contra el primer anticuerpo se añaden a la muestra para producir el anticuerpo marcado *in situ*.

35 El marcador utilizado para el primer o el segundo anticuerpo es cualquiera funcionalidad detectable que no interfiera con la unión de los compañeros de unión. Los ejemplos marcadores adecuados son los conocidos en la técnica para su uso en inmunoensayos, que incluyen restos que pueden detectarse directamente, tales como fluorocromos, marcadores quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que deben reaccionar o derivatizarse para su detección. Los ejemplos de estos marcadores incluyen los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos, tales como quelados de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana, luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, biotina/estreptavidina, biotina/estreptavidina-beta-galactosidasa con MUG, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares. Están disponibles procedimientos convencionales para unir estos marcadores covalentemente a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, pueden emplearse agentes de acoplamiento, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-amidatos, benzidina bis-diazotizada y similares para marcar los anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos descritos anteriormente.

50 La conjugación de estos marcadores, que incluyen marcadores enzimáticos, al anticuerpo es un procedimiento convencional para los expertos en la técnica de los inmunoensayos. Véase, por ejemplo, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzymeantibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en Methods in

Enzymology, ed. J. J. Langone y H. Van Vunakis, vol. 73 (Academic Press, Nueva York, N.Y., 1981), pp. 147-166.

Después de la adición del anticuerpo marcado se determina la cantidad del anticuerpo unido eliminando el exceso de anticuerpo marcado no unido mediante un lavado y después midiendo la cantidad del marcador unido, empleando un método de detección específico del marcador, y correlacionando la cantidad medida con la cantidad de efector en la muestra. Por ejemplo, en el caso de enzimas, la cantidad de color desarrollado y medido puede correlacionarse con la cantidad de efector. De modo específico, si HRP es el marcador, el color se detecta utilizando el sustrato OPD y midiendo la absorbancia a 490 nm.

En un ejemplo, después de haber lavado de la fase inmovilizada el segundo anticuerpo marcado con una enzima dirigido contra el primer anticuerpo no marcado, se revela el color o la quimioluminiscencia y se mide incubando el reactivo de captura inmovilizado con un sustrato de la enzima. Entonces se calcula la cantidad de la concentración secretada mediante comparación con el color o la quimioluminiscencia generada por el efector patrón ensayado en paralelo.

Los ELISA que son útiles para la presente invención han sido descritos por Gauthier et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, octubre 2005, 4101-4100, y en el documento WO1999/45136. Brevemente, bacterias de un cultivo realizado durante la noche se subcultivan en placas de microtitulación para permitir que la proteína efectora secretada de interés se adhiera a la placa (como alternativa, puede utilizarse el sobrenadante de las bacterias centrifugadas). El efector unido a la placa (o translocador) se detecta con un anticuerpo anti-efector o un anticuerpo anti-translocador, respectivamente, y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. El ensayo se revela añadiendo dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD) y, después de extinguir, se analiza en un lector de placas.

Según la invención, en dicha primera etapa se determina la cantidad de proteína efectora secretada debido a su capacidad para unirse (interaccionar) con su molécula de chaperona cognada (para los objetivos de la invención, en este contexto, el término "chaperona" es sinónimo de las chaperonas de clase I (o chaperonas de clase 1A), según se definió anteriormente, es decir, las moléculas de chaperonas necesarias para la secreción de los efectores). Así, el ensayo en la primera etapa se basa en medir la cantidad de efector que está unido a su chaperona.

La cantidad de efector secretado puede determinarse mediante cualquier procedimiento que sea adecuado para ensayar una proteína que está unida a su compañero de unión.

Según ciertas realizaciones, la proteína efectora se detecta mediante un ensayo de tipo ELISA que puede realizarse según el principio descrito anteriormente, empleando la metodología convencional disponible en el mercado. Como ejemplo, este ensayo puede realizarse como sigue: la chaperona se inmoviliza sobre una placa de microtitulación (por ejemplo, mediante un anticuerpo unido a una placa contra la chaperona, o uno de sus fragmentos, o contra un marcador unido a la chaperona, por ejemplo, GST, His, Myc). El lisado o el sobrenadante de un cultivo de bacterias que normalmente secretan la proteína efectora y que han sido tratadas con el compuesto de ensayo (en paralelo, una muestra control de bacterias no tratadas) se añade a la placa y se determina la cantidad de proteína efectora por medio de un anticuerpo contra la proteína efectora y un anticuerpo secundario que porta un marcador detectable, tal como se describió anteriormente, por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o un fluoróforo. La figura 1A muestra, de modo esquemático, el mecanismo de secreción de un efector que está unido a una chaperona cognada (denominada P en la figura) antes de ser secretado. La figura 1B ejemplifica un ELISA, en el que la chaperona P se reviste sobre una placa, y el efector se determina midiendo la cantidad de anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo anti-efector primario.

Preferiblemente, se emplea un ELISA según se describe en el ejemplo 1 (para los objetivos de esta invención, este ELISA se denomina "ELISA de secreción"; en el caso de que se emplee otro formato distinto del ELISA, este ensayo se denomina "ensayo de secreción"). Un ELISA de secreción permite la detección de las moléculas secretadas, por ejemplo, moléculas de efector, directamente del sobrenadante del cultivo. La principal ventaja es la posibilidad de ensayar hasta 96 muestras por placa de múltiples pocillos, que incluye la medición del crecimiento del cultivo y del efector a las 24 horas. Hasta la fecha se ha empleado con éxito para ensayar 384 muestras por persona-día, y se emplea habitualmente en lugar de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) y la transferencia Western. Como ejemplo, puede establecerse un ensayo de secreción empleando las parejas de efector/chaperona SptP/SicP (según se describe en el ejemplo 1) o SipA-Flag/InvB.

Aunque se pone como ejemplo a *Salmonella typhimurium*, el principio descrito anteriormente puede aplicarse a cualquier otra bacteria Gram-negativa patógena que secrete la proteína efectora por medio del T3SS. Así, el ensayo puede basarse en cualquier combinación de proteínas que represente una pareja de efector/chaperona empleando, como componente revestido, la respectiva chaperona para el respectivo efector que se va a detectar. El efecto del compuesto puede analizarse comparando la cantidad medida con la de un control en el que la célula

bacteriana no ha sido tratada con el compuesto.

Los ejemplos de proteínas efectoras de bacterias distintas de *Salmonella typhimurium* son YopE, YopH, YpkA/YopO, YopP/YopJ, YopM, YopT, de *Yersinia* spp.; Tir de *E. coli*; ExoS, ExoT, ExoY de *P. aeruginosa*; IpaA, IpaB, y IpgD de *Shigella* spp.; AvrPto de *P. syringae* pv. *Tomato*; AvrBs2 de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*; y AvrBs3 de *X. campestris* pv. *Vesicatoria*. Por ejemplo, para identificar un inhibidor de *Yersinia*, en lugar del efector SptP (de *Salmonella*), puede utilizarse la chaperona SycT como proteína revestida, y el efector que se va a detectar es YopT. Las chaperonas y las proteínas efectoras (incluyendo sus secuencias de proteína y de ADN), así como sus combinaciones, son conocidas en la bibliografía, ofreciéndose ejemplos de efectores y parejas de efector/chaperona útiles en las tablas 1-5. Tabla 1: *Salmonella enterica*; Tabl 2: *Yersinia pestis*/*Yersinia enterocolitica*/*Yersinia pseudotuberculosis*; Tabla 3: *Escherichia coli*; Tabla 4: *Shigella flexneri*/*Shigella sonnei*; Tabla 5: *Chlamydia* (*Chlamydia pneumoniae*/*Chlamydia trachomatis*/*Chlamydia muridarum*/*Chlamydia felis*).

En el caso de que una chaperona para un efector concreto no haya sido (aún) identificada, su existencia puede ser determinada, por ejemplo, empleando análisis bioinformáticos, según se describe en Pallen et al., 2005, BMC Microbiol., 5:9.

A menudo, la activación total del sistema de secreción de proteínas de tipo III requiere que la célula bacteriana se ponga en contacto con su célula hospedante. Bajo condiciones *in vitro*, la expresión de los componentes de T3SS puede ser baja. Por tanto, tal como se describe en el documento WO2005/113791, preferiblemente el procedimiento de la invención comprende además la etapa de activar el sistema de secreción de proteínas de tipo III antes de la etapa de detectar la cantidad de efector secretado hacia fuera de la célula bacteriana. La etapa de activar el sistema de secreción de proteínas de tipo III puede realizarse antes o después de exponer la célula hospedante a un compuesto de ensayo. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para aumentar la actividad de un sistema de secreción de proteínas de tipo III en una célula bacteriana concreta y estos se describen en el documento WO2005/113791, por ejemplo, poniendo en contacto directamente una célula bacteriana con su célula hospedante eucariota, o aplicando condiciones de laboratorio *in vitro* seleccionadas, tales como temperatura, osmolaridad, nutrientes, cationes divalentes, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ , valor del pH, y fase del crecimiento. Por ejemplo, para activar la secreción de Yop *in vitro*, generalmente *Yersinia* se cultiva a 28 °C en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$ , y después se traslada a 37 °C. Al igual que en *Yersinia* spp., también en *P. aeruginosa* la secreción de proteínas se activa bajo condiciones de poco  $\text{Ca}^{2+}$ . El cultivo de *Shigella* o de *E. coli* enteropatógena a 37 °C activa su T3SS. Para *Salmonella typhimurium*, el sistema de secreción de proteínas de tipo III de SPI-I preferiblemente se activa *in vitro* bajo condiciones de bajo contenido en oxígeno, alta osmolaridad, y pH ligeramente alcalino (pH 8).

En una realización preferida, la primera etapa del procedimiento de la invención es un método de selección realizado en formato de alta capacidad de procesamiento, para el cual están disponibles en el mercado varios ensayos útiles.

Según realizaciones preferidas, el ensayo de alta capacidad de procesamiento se basa en la tecnología Alpha basada en esferas ("Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay", ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado, Perkin Elmer), que es adecuado para la conversión de ensayos ELISA (también denominados "AlphaLISA") y permite unos ensayos homogéneos muy sensibles que pueden automatizarse con facilidad.

Esta tecnología se basa en una señal que depende de la proximidad de la denominada esfera donante y una esfera aceptora. El AlphaScreen se basa en el uso de esferas "donantes" y "aceptoras" que están revestidas con una capa de hidrogel que proporciona grupos funcionales para la bioconjugación. Las esferas donantes también están revestidas con una capa fotosensibilizante que, tras una excitación con 680 nm, genera oxígeno singlete. Si las esferas se ponen en proximidad cercana, la semivida del oxígeno singlete es lo suficientemente larga como para que viaje hasta la esfera aceptora y produzca quimioluminiscencia.

Como ejemplo, cuando el efector se detecta directamente, es decir, sin estar unido a su chaperona, el ensayo está en el formato denominado de sándwich, que requiere dos anticuerpos que reconocen diferentes epitopos sobre el efector. Un anticuerpo está biotinilado y es capturado por la esfera donante revestida con estreptavidina. El segundo anticuerpo está acoplado con la esfera aceptora. La presencia del efector produce un inmunosándwich, haciendo que las esferas donantes y aceptoras se pongan en proximidad cercana. Si la concentración del efector es alta se forman inmunosándwiches de donante-aceptor, lo cual produce un aumento en la señal.

En el caso de que el ensayo se realice según la realización que se basa en la interacción del efector con su chaperona cognada, como ejemplo, una esfera porta la chaperona y la otra esfera es un anticuerpo anti-efector. La chaperona puede estar directamente conjugada con las esferas o, como alternativa, pueden emplearse esferas patrón revestidas con estreptavidina a las cuales se unen las moléculas de chaperona biotinilada.

La detección puede ser directa o indirecta: en el formato de ensayo directo, el anticuerpo anti-efector o la

chaperona se conjuga directamente sobre la esfera. Esto proporciona la comodidad de un ensayo listo para la selección. En un ensayo indirecto, un anticuerpo secundario, o proteína A, se conjuga con la esfera. Este procedimiento minimiza el uso de anticuerpo primario cuando sea muy caro o difícil de obtener.

Como ejemplo, el ensayo puede realizarse como una reacción en dos etapas incubando, por ejemplo, durante 1 h, la muestra con esferas revestidas con la chaperona biotinilada y esferas revestidas con anticuerpo anti-efector. A esto le sigue una incubación con esferas revestidas covalentemente con estreptavidina durante 30 min. Después de las etapas de incubación, se cuantifica la luz generada de una reacción quimioluminiscente dentro de las esferas. El ensayo puede realizarse en placas de 384 pocillos con un volumen de muestra de 5 µl.

Otros tipos de ensayos, aunque menos preferidos, para el formato de alta capacidad de procesamiento se seleccionan de tecnologías de detección de fluorescencia, por ejemplo, los ensayos de fluorescencia de resolución en el tiempo, tales como el fluoroinmunoensayo de lantánidos potenciado por la disociación (DELFA) o la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). DELFA emplea un quelado de lantánido con un tiempo de vida fluorescente largo (>100 µs) para evitar la interferencia de fondo de componentes del ensayo, tales como tampones, medios, reactivos o compuestos. El marcador absorbe luz en el intervalo de UV de un láser de nitrógeno o bombilla de relámpago y, dependiendo del lantánido utilizado, emite fluorescencia entre 500 y 700 nm. Este ensayo incluye etapas de lavado, pero este inconveniente puede aceptarse, en algunos casos, como compensación por la ventaja de una alta detección.

La mayoría de los kits DELFA comerciales se basan en ensayos de “tipo sándwich” no competitivos. Como ejemplo, para la presente invención, la molécula de chaperona está unida al soporte sólido, mientras que un anticuerpo anti-efector está marcado, por ejemplo, con europio. La cantidad de Eu medido se correlaciona directamente con la cantidad de efector unido a la chaperona.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para controlar el ensamblaje de los componentes estructurales para formar el complejo de la aguja de T3SS, en el que el ensamblaje del complejo de la aguja se determina detectando un componente estructural unido por láser [x] cuando está asociado con un componente estructural preexistente [x-1], o con un complejo preformado que contiene el componente [x-1], respectivamente.

En el procedimiento de la invención para determinar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad para inhibir la función del T3SS, este procedimiento representa la segunda etapa.

En dicha segunda etapa (también denominada, para los objetivos de esta invención “ensayo de estructura” o “ELISA de estructura” cuando se realiza en formato ELISA), un resultado positivo de la primera etapa, es decir, un compuesto que inhibe la secreción de un efector o un translocador, se ensaya para su capacidad para inhibir el ensamblaje de los componentes estructurales para formar el complejo de la aguja. Esta etapa de ensayo aprovecha el hecho de que el ensamblaje es un proceso discontinuo, en el que un componente estructural [x] se asocia con un componente estructural preexistente [x-1], o con un complejo preformado que contiene el componente [x-1], respectivamente.

Aunque se pone como ejemplo a *Salmonella typhimurium*, la subestructura de la base está formada por los componentes estructurales PrgH, PrgK e InvG, mientras que PrgI y PrgJ constituyen las subestructuras de la aguja y la varilla interna que, en la cadena del ensamblaje natural, se añaden después de que se haya formado la base. Basándose en esta secuencia, como ejemplo, PrgI puede ser el componente [x], mientras que PrgH representa [x-1]. Como alternativa, PrgK o InvG pueden representar el componente [x-1], o un complejo que consiste en PrgH y PrgK, o un complejo que contiene los tres componentes de la base PrgH, PrgK e InvG. Poniendo como ejemplo estos dos componentes estructurales, el ensayo se diseña de modo que PrgH es capturado sobre las placas de ensayo, y PrgI, si está asociado con la base preformada que contiene PrgH, se detecta. La figura 2A muestra de modo esquemático el ensamblaje del inyectisoma. La figura 2B ejemplifica un ELISA, en el que PrgH se une a una placa, y la unión del componente del filamento de la aguja PrgI se determina midiendo la cantidad de anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo anti-PrgI primario.

Para realizar el ensayo de ELISA de estructura de dicha segunda etapa, como ejemplo, se cultivan células de *Salmonella typhimurium* que portan el plásmido que codifica un PrgH marcado, por ejemplo, PrgH marcado con His, en presencia o ausencia de dicho compuesto de ensayo. Las células se lisan y el lisado se añade a placas de ensayo revestidas con níquel, de modo que el PrgH marcado con His contenido en el lisado bacteriano se unirá a las placas de ensayo. Después de un periodo de tiempo suficiente para que PrgH se una a las placas, estas se lavan. En la siguiente etapa, las placas se ensayan para la presencia de PrgI: en ausencia del compuesto de ensayo (o en presencia de un compuesto de ensayo que no afecta a la asociación de PrgI con la estructura de base preformada), PrgI se une al complejo preformado y puede detectarse mediante un anticuerpo anti-PrgI primario y un anticuerpo secundario que porta un marcador detectable. Como alternativa a la expresión del

componente estructural [x-1] como una proteína de fusión marcada con His, este puede portar otro marcador, por ejemplo, el marcador GST (glutación-S-transferasa humana), que está unido a una placa revestida a través de anticuerpos GST. Otros marcadores de fusión empleados habitualmente son el marcador HA, MBP, el marcador Myc.

- 5 En el caso de que el ensayo de estructura no revele un efecto inhibitor sobre el ensamblaje de PrgI con el complejo de base preformado, se ensayan otras combinaciones del componente estructural [x-1]/[x] de *Salmonella*, por ejemplo, el complejo PrgH/PrgK como componente [x-1] e InvG como componente [x].

10 Un resultado negativo para un compuesto de ensayo con respecto a un efecto inhibitor sobre la unión de PrgI puede ser debido al efecto inhibitor de un compuesto de ensayo sobre la ATPasa, que está asociada con la base del T3SS y es necesario para dirigir proteínas hacia la aguja. Este efecto inhibitor sobre la ATPasa será confirmado y posteriormente puede analizarse, por ejemplo, para descubrir si el compuesto inhibe la función catalítica o si se dirige a otra parte de la enzima. Los resultados de estos análisis son útiles como punto de partida para optimizar un compuesto como inhibidor específico de la ATPasa asociada a T3SS de esta bacteria.

15 Aunque se pone como ejemplo a *Salmonella typhimurium*, el principio descrito anteriormente del ELISA de estructura puede aplicarse a cualquier otra bacteria Gram-negativa patógena que emplee el T3SS. Así, el ensayo de estructura puede utilizar cualquiera de los componentes estructurales que forman el complejo de la aguja, empleando el componente [x-1] como el componente revestido, y la proteína ensamblada después [x] como componente que va a ser detectado. Como ejemplo, para identificar un inhibidor de *Shigella flexneri*, en lugar de PrgH puede utilizarse el componente mxiG como la proteína revestida, y en lugar de PrgI, mxiH es el componente  
20 que se va a detectar. Los respectivos componentes son conocidos en la bibliografía, y en la tabla 6 se ofrecen ejemplos de proteínas estructurales que se corresponden con PrgH, PrgI e InvG, que pueden utilizarse en el ensayo estructural de la invención. En la bibliografía pueden encontrarse homólogos de otras proteínas estructurales.

25 Los compuestos identificados como inhibidores del T3SS de una bacteria específica pueden ensayarse para determinar si también bloquean el T3SS de otra bacteria Gram-negativa. Habitualmente, el compuesto primero se ensaya para su capacidad para inhibir la secreción de un efector o translocador de otra bacteria según los procedimientos descritos anteriormente. Si el resultado es positivo, puede esperarse que un compuesto que ha demostrado que interfiere con cierta etapa del ensamblaje en una primera bacteria, inhiba la misma etapa del ensamblaje de la segunda bacteria. Por tanto, el ensayo de estructura para la segunda bacteria comprenderá  
30 componentes estructurales que son homólogos a los de la primera bacteria. Para obtener la especificidad de un compuesto como inhibidor de la segunda bacteria, el compuesto puede modelarse para que forme los componentes estructurales pertinentes de cualquiera de las dos bacterias.

35 El procedimiento de la invención permite identificar inhibidores del T3SS que sean muy específicos porque interfieren con una etapa discreta en el ensamblaje del inyector. Cuando se ha demostrado que un compuesto interfiere con la unión de un componente estructural [x] con un componente [x-1], pueden obtenerse las estructuras cristalinas de estos componentes, y puede optimizarse la estructura de un compuesto de ensayo modelándolo en dicha estructura o sobre dicha estructura.

40 Los compuestos identificados por el procedimiento de la invención como inhibidores del T3SS después se ensayan en modelos de enfermedad animal mediante el ensayo de la toxicidad. Los compuestos que bloquean el T3SS también pueden ensayarse en los modelos de enfermedad animal pertinentes, por ejemplo, EPEC/EHEC en conejos, y *S. typhimurium* en ratones. Los compuestos generalmente se ensayan primero para su toxicidad en ratones utilizando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Inicialmente, la farmacocinética del fármaco se ensaya midiendo los niveles del fármaco en la sangre después de unas horas tras la ingestión oral del fármaco. Esta información proporciona una indicación de la biodisponibilidad del compuesto.  
45 También se realiza el ensayo de la toxicidad para determinar la máxima dosis tolerada. Para hacer esto, se administran concentraciones crecientes del fármaco a un animal hasta un nivel de 1000 mg/kg.

50 El ensayo inicial en modelos de enfermedad animal puede realizarse, por ejemplo, mediante la inhibición de una enfermedad mediada por EPEC. Tras haber completado los estudios de toxicidad y biodisponibilidad iniciales, se ensayan modelos de infección animal con los compuestos más prometedores. Estos ensayos convencionales se emplean para determinar el efecto de los compuestos prometedores sobre RDEC-1 (el patógeno EPEC de conejo) y RDEC-1 que contiene la verotoxina (un modelo animal de EHEC muy conocido) en conejos. Se mide la cantidad de la diarrea, y se realiza una patología sobre los animales infectados para determinar el grado de colonización con y sin el fármaco. Estos estudios indican si los compuestos de la secreción de tipo III pueden afectar al resultado de estas infecciones.

55 Los compuestos que han demostrado tener un efecto sobre el T3SS de *Salmonella typhimurium* por medio del

procedimiento de la invención se ensayan, según se describe en el documento WO 1999/045136 en modelos de enfermedad animal determinando la inhibición de la enfermedad de *Salmonella typhimurium* en el modelo tifoide murino. La infección por *S. typhimurium* en ratones Balb/C conduce al tifoide murino, que finalmente produce la muerte del animal. Se emplean dos vías de infección: oral ( $LD_{50} = 10^6$ ) e intravenosa ( $LD_{50} = 10^2$ ). En vez de esto, los animales pueden sacrificarse en diversos momentos, sus hígados y bazo se homogeneizan, y se cuenta el número de *S. typhimurium* en estos órganos según el procedimiento de Leung et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 88:11470-11474, 1991). Esta técnica es un indicador de la infectividad. Para ensayar la capacidad de los inhibidores para bloquear la virulencia de *S. typhimurium*, los ratones reciben diversas dosis del compuesto al mismo tiempo como una infección oral e IV. La dosis depende de los resultados de los ensayos de toxicidad y biodisponibilidad. La capacidad de estos compuestos para alterar las velocidades de colonización de órganos es un excelente indicador de la eficacia de esos compuestos como potenciales productos terapéuticos antibacterianos.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1:

A) Mecanismo de secreción de un efector que está unido a una chaperona cognada.

B) ELISA de secreción para la detección de un efector unido a su chaperona cognada.

Figura 2:

A) Mecanismo del ensamblaje del inyectisoma.

B) ELISA de estructura para detección de un complejo de la aguja ensamblado.

### Ejemplo 1 - ELISA de secreción para detectar la proteína efectora SptP cuando está unida a su chaperona cognada SicP

GST-SicP se expresa en *E. coli* (BL21, plásmido X), las células se lisan y la proteína se purifica mediante una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna de trampa de GST. La concentración final de proteínas de SicP para el prerrevestimiento es de 60 µg/ml en TBS. Se lavaron placas de múltiples pocillos de fondo plano de 96 pocillos (300 µl, placas transparente de ELISA de 96 pocillos Microtest™, BD Falcon, EEUU) con 100 µl de TBS por pocillo y se prerrevisten con 100 µl de SicP en disolución durante 2 horas a temperatura ambiente, o a 4 °C durante la noche mientras se agita lentamente. Se retira todo el líquido y las placas se conservan a -80 °C. Se realizan los ELISA con placas conservadas durante hasta un año.

Las bacterias se cultivan en placas de pocillos profundos de 2 ml (Riplate® sw 2 ml, Ritter) en 1,8 ml de medio de crecimiento LB (NaCl 0,3 M, arabinosa al 0,012%, antibióticos) durante al menos 16 horas. Se obtiene el sobrenadante del cultivo sedimentando las células a 4000 g durante 15 minutos (Multifuge 3 SR, Heraeus, Reino Unido).

Las placas prerrevestidas se envuelven en papel para evitar la condensación y se calientan hasta la temperatura ambiente. Durante las etapas de incubación, la placa se cubre con una lámina de aluminio y se coloca en un agitador; el protocolo se realiza mejor a temperatura ambiente. Una etapa de lavado consiste en añadir y retirar 200 µl de PBS-T por pocillo.

La unión no específica se minimiza bloqueando con 300 µl de albúmina de suero bovina (BSA) al 3% en PBS durante una hora, tras lo cual se retira la disolución de bloqueo sin una etapa de lavado. Se cargan 100 µl del sobrenadante del cultivo durante una hora para capturar la proteína efectora, seguido de tres etapas de lavado. Se añaden 100 µl de la dilución del primer anticuerpo (1:3000 anti-SpTP monoclonal de ratón en PBS-T) durante una hora, seguido de tres etapas de lavado. Se añaden 100 µl de la dilución del anticuerpo secundario (1:15000 α-ratón de conejo, acoplado con peróxidasa de rábano (HRP)) durante una hora, seguido de tres etapas de lavado. Para la etapa de detección final, se aplican 100 µl de sustrato recién preparado, se prepara 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) como una disolución madre 100x disolviendo 10 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO). La disolución de trabajo se prepara mezclando 100 µl de la disolución madre 100x, 2 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, y 10 ml de tampón citrato 0,1 M (pH 6), y se mantiene la temperatura ambiente mientras se aplica.

A medida que se revela un color azul, se mide la cinética de la reacción empleando un lector de placas (GENios Pro, Tecan, EEUU) a 640 nm. En cuanto aparece un color azul marcado, la reacción se detiene empleando 25 µl de ácido sulfúrico 2 M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se mide la absorbancia a 450 nm.

El ensayo descrito anteriormente puede convertirse en el formato HTS, por ejemplo, un AlphaScreen y/o emplear, para identificar inhibidores de otras bacterias Gram-negativas, efectores y parejas de efector/chaperona de dichas

bacterias. Se ofrecen ejemplos en las tablas 1-5.

Tabla 1

| <i>Salmonella enterica</i> |        |  |           |        |
|----------------------------|--------|--|-----------|--------|
| Efactor                    | AccNr  |  | Chaperona | AccNr  |
| SptP                       | P74873 |  | SicP      | O85300 |
| SopB                       | 030916 |  | SigE      | O30917 |
| SopA                       | B5QZK6 |  | InvB      | P0A1N0 |
| SopE2                      | Q7CQD4 |  | InvB      | P0A1N0 |
| SipA                       | Q56027 |  | InvB      | P0A1N0 |
| SopE                       | O52623 |  | InvB      | P0A1N0 |
| SipB                       | Q56019 |  | SicA      | P69066 |
| SipC                       | Q56020 |  | SicA      | P69066 |
| SseF                       | 084951 |  | SscA      | O84946 |
| SseB                       | Q7BVH7 |  | SpiC      | P74863 |
| SseC                       | 084947 |  | SpiC      | P74863 |
| SseL                       | Q8ZNG2 |  | SrcA      | Q8ZNP3 |
| PipB2                      | D0ZTZ7 |  | SrcA      | Q8ZNP3 |
| AvrA                       | 030621 |  | ---       |        |
| CopR                       | Q8ZQ53 |  | ---       |        |
| SteA                       | Q8ZPD7 |  | ---       |        |
| SteB                       | Q8ZPA6 |  | ---       |        |
| SteC                       | Q8ZP57 |  | ---       |        |
| PipB                       | Q8ZQ59 |  | ---       |        |
| SifA                       | Q56061 |  | ---       |        |
| SifB                       | Q9KIB9 |  | ---       |        |
| SlrP                       | Q8ZQQ2 |  | ---       |        |
| SsaH                       | Q9ZEF4 |  | ---       |        |
| SsaI                       | Q9ZEF3 |  | ---       |        |
| SsaJ                       | P74852 |  | ---       |        |
| SseG                       | O84952 |  | ---       |        |
| SseI                       | Q8ZQ79 |  | ---       |        |
| SseJ                       | Q9FD10 |  | ---       |        |
| SspH1                      | D0ZVG2 |  | ---       |        |
| SspH2                      | D0ZPH9 |  | ---       |        |

# ES 2 526 316 T3

|      |        |  |     |  |
|------|--------|--|-----|--|
| SteA | Q8ZPD7 |  | --- |  |
| SteB | D0ZI38 |  | --- |  |
| SteC | Q8ZP57 |  | --- |  |
| SipD | Q56026 |  | --- |  |
| SseD | Q9R803 |  | --- |  |
| SpvB | C0Q8H0 |  | --- |  |

Tabla 2

| <i>Yersinia</i> |        |  |           |               |
|-----------------|--------|--|-----------|---------------|
| Efector         | AccNr  |  | Chaperona | AccNr         |
| YopN            | P68640 |  | SycN/YscB | P61380/Q56973 |
| YopT            | O68703 |  | SycT      | P0C2V9        |
| YopE            | P31493 |  | SycE      | Q79NJ9        |
| YscX            | P0C2N4 |  | YscY      | P61417        |
| YopB            | Q06114 |  | SycD      | C5IZG5        |
| YopD            | Q06131 |  | SycD      | C5IZG5        |
| YopH            | P08538 |  | SycH      | Q56934        |
| YopO            | Q93KQ6 |  | SycO      | Q84GR4        |
| YopTI           | P0C2N1 |  | ---       |               |
| YpkA            | Q05608 |  | ---       |               |
| LcrV            | Q3I759 |  | ---       |               |
| YopP            | O52162 |  | ---       |               |
| YopM            | P17778 |  | ---       |               |
| YopJ            | A1JUC5 |  | ---       |               |
| VirG            | A1JU90 |  | ---       |               |
| YsaH            | A1JQC0 |  | ---       |               |
| YspB            | A1JQ86 |  | ---       |               |
| YsaW            | A1JQA7 |  | ---       |               |
| TyeA            | A9R9I1 |  | ---       |               |
| YopR            | D1U2F5 |  | ---       |               |
| YsrR            | Q9KKI8 |  | ---       |               |
| YitR            | Q8CLV0 |  | ---       |               |
| YitA            | Q8D1P8 |  | ---       |               |
| YitB            | Q8D1P7 |  | ---       |               |

|      |        |  |     |  |
|------|--------|--|-----|--|
| YitC | Q8D1P6 |  | --- |  |
| YipA | Q7CL72 |  | --- |  |
| YipB | Q8CLU9 |  | --- |  |

Tabla 3

| <i>Escherichia coli</i> |        |  |           |        |
|-------------------------|--------|--|-----------|--------|
| Efector                 | AccNr  |  | Chaperona | AccNr  |
| SepD                    | Q5WME1 |  | ---       |        |
| Map                     | B8ZYG0 |  | CesT      | Q47015 |
| SepZ                    | B8ZYN7 |  | CesT      | Q47015 |
| Tir                     | Q9KWH9 |  | CesT      | Q47015 |
| EspD                    | Q7DB81 |  | CesD2     | O52150 |
| EspF                    | Q7DB85 |  | CesF      | C6UYM0 |
| EspB                    | Q8XC86 |  | CesAB     | O52124 |
| EspD                    | Q7DB81 |  | CesD      | Q9AJ22 |
| EspA                    | Q7DB80 |  | CesAB     | O52124 |
| EspB                    | Q8XC86 |  | CesD      | Q9AJ22 |
| NleA                    | A9ZNG8 |  | CesT      | Q47015 |
| NleH                    | A9ZNE5 |  | CesT      | Q47015 |
| NleF                    | C6USQ4 |  | CesT      | Q47015 |
| ---                     |        |  | Ror8      | C8UFL9 |
| ---                     |        |  | YgeG      | C8UAJ9 |
| EspH                    | B8ZYG2 |  | ---       |        |
| EspJ                    | C6UYI2 |  | ---       |        |
| NleA1                   | A1KWP2 |  | ---       |        |
| NleA2                   | A1KWP3 |  | ---       |        |
| NleA3                   | A1KWP4 |  | ---       |        |
| NleA4                   | A1KWP5 |  | ---       |        |
| NleA5                   | A1KWP6 |  | ---       |        |
| NleA6-1                 | A1KWP7 |  | ---       |        |
| NleA6-2                 | A1KWP8 |  | ---       |        |
| NleA7                   | A1KWP9 |  | ---       |        |
| NleA8-1                 | A1KWQ0 |  | ---       |        |
| NleA8-2                 | A1KWQ1 |  | ---       |        |

|        |        |  |     |  |
|--------|--------|--|-----|--|
| NleA9  | A1KWQ2 |  | --- |  |
| NleA10 | A1KWQ3 |  | --- |  |
| NleA11 | A1KWQ4 |  | --- |  |

Tabla 4

| <i>Shigella</i> |              |  |                  |              |
|-----------------|--------------|--|------------------|--------------|
| <b>Efector</b>  | <b>AccNr</b> |  | <b>Chaperona</b> | <b>AccNr</b> |
| IpaA            | P18010       |  | SpaK             | P35530       |
| IpgB1           | Q6XVY7       |  | SpaK             | P35530       |
| OspC3           | Q3YTS0       |  | SpaK             | P35530       |
| OspB            | Q3YTY8       |  | SpaK             | P35530       |
| IpaB            | P18011       |  | IpgC             | P0A2U4       |
| IpaC            | P18012       |  | IpgC             | P0A2U4       |
| IcsB            | P33546       |  | IpgA             | P33547       |
| IpgD            | Q07566       |  | IpgE             | Q6XVY3       |
| OspF            | Q8VSP9       |  | ---              |              |
| VirA            | Q3YTK0       |  | ---              |              |
| OspC1           | Q3YTU3       |  | ---              |              |
| OspC2           | Q3YTS7       |  | ---              |              |
| OspC3           | Q3YTS0       |  | ---              |              |
| OspD1           | Q3YTX0       |  | ---              |              |
| OspD2           | Q3YTY4       |  | ---              |              |
| OspD3           | Q3YTU2       |  | ---              |              |
| OspE1           | Q9AJU4       |  | ---              |              |
| OspE2           | Q9AJW6       |  | ---              |              |
| IpaH3           | Q83RJ4       |  | ---              |              |
| OspG            | Q3YTH2       |  | ---              |              |
| OspE1           | Q327E9       |  | ---              |              |
| OspE2           | Q3YTU8       |  | ---              |              |
| IpaH9.8         | O85159       |  | ---              |              |
| IpaH4.5         | P18009       |  | ---              |              |
| IpaH7.8         | P18014       |  | ---              |              |

Tabla 5

| <i>Chlamydia</i> |        |  |             |        |
|------------------|--------|--|-------------|--------|
| Efactor          | AccNr  |  | Chaperona   | AccNr  |
| CopB             | O84582 |  | Scc2 (SycD) | A9NIN9 |
| CopB2            | O84583 |  | Scc3 (SycD) | Q9PJG4 |
| CT694            | O84700 |  | ---         |        |
| pkn5             | O84680 |  | ---         |        |
| Tarp             | Q6GX35 |  | ---         |        |
| IncA             | O69196 |  | ---         |        |
| IncB             | Q9Z8P7 |  | ---         |        |
| IncC             | Q3KMC9 |  | ---         |        |
| CopN             | Q9Z8L4 |  | ---         |        |
| CPn0206          | Q9Z8X8 |  | ---         |        |
| CPn0330          | Q9Z8K8 |  | ---         |        |
| CPn0374          | Q9Z8G9 |  | ---         |        |
| CPn0474          | Q9Z877 |  | ---         |        |
| CPn0490          | Q9Z861 |  | ---         |        |
| CPn0648          | Q9Z7Q6 |  | ---         |        |
| CPn0671          | Q9Z7N3 |  | ---         |        |
| CPn0705          | Q9Z7K0 |  | ---         |        |
| CPn0725          | Q9Z7I0 |  | ---         |        |
| CPn0761          | Q9Z7E5 |  | ---         |        |
| CPn0764          | Q9Z7E2 |  | ---         |        |
| CPn0770          | Q9Z7D6 |  | ---         |        |
| CPn0774          | Q9Z7D2 |  | ---         |        |
| CPn0808          | Q9Z798 |  | ---         |        |
| CPn0809          | Q9Z797 |  | ---         |        |
| CPn0821          | Q9Z785 |  | ---         |        |
| CPn0853          | Q9Z753 |  | ---         |        |
| CPn0859          | Q9Z747 |  | ---         |        |
| CPn0879          | Q9Z727 |  | ---         |        |
| CPn1005          | Q9Z6Q4 |  | ---         |        |
| CPn1019          | Q9Z6P0 |  | ---         |        |
| CPn1020          | Q9Z6N9 |  | ---         |        |

|         |        |  |              |        |
|---------|--------|--|--------------|--------|
| CPn1022 | Q9Z6N7 |  | ---          |        |
| CPn1032 | Q9Z6M7 |  | ---          |        |
| ---     |        |  | Scc1 (SycE1) | 034021 |
| ---     |        |  | SycE2        |        |
| ---     |        |  | SycE3        |        |
| ---     |        |  | IcrH-2       | Q9Z6N8 |

### Ejemplo 2 - ELISA de estructura para detectar la unión de PrgI al elemento de la base que contiene PrgH

El procedimiento empleado en este experimento permite controlar un complejo de la aguja totalmente ensamblado con una alta velocidad de procesamiento. Se base en capturar el complejo de la aguja (PrgH-marcador de polihistidina) sobre placas de Ni-NTA y detectar el filamento de la aguja empleando un anticuerpo anti-PrgI. Por tanto, solo se detecta un complejo de la aguja totalmente ensamblado.

La cepa de *Salmonella thyphimurium* no flagelada SB906 que porta el regulador transcripcional hilA bajo el control del promotor araBAD se complementa con un plásmido que porta PrgH con un marcador de polihistidina C-terminal (His<sub>18</sub>). Las bacterias se cultivan en placas de pocillos profundos de 2 ml (Riplate® sw 2 ml, Ritter) en 1,8 ml de LB (NaCl 0,3 M, arabinosa al 0,012%, antibióticos) durante al menos 18 horas. Las células se recolectan mediante sedimentación a 4000 g durante 15 minutos (Multifuge 3 SR, Heraeus, Reino Unido). El sedimento celular se resuspende en 400 µl de tampón de lisis (sacarosa 0,5 M en tampón Tris 0,15 M, lisozima 0,48 mg/ml, EDTA 5 mM) y se incuba a 14 °C durante 45 minutos en un termoagitador. Los tubos después se incuban a 37 °C durante 20 minutos. Esta etapa puede realizarse en el termoagitador o en un baño de agua, dependiendo del número de muestras. Se añaden 100 µl de una mezcla de LDAO/sal (6 partes de LDAO al 10%, 44 partes de NaCl 5 M) a cada muestra, seguido de otra etapa de incubación de 5 minutos a 37 °C. Se añaden 4 µl de MgCl<sub>2</sub>, seguido de una incubación durante 5 minutos. El lisado de células final después se mantiene a 4 °C durante 10-20 minutos.

Se diluyen 20 µl del lisado celular con 80 µl de tampón de resuspensión (PBS, NCI 0,5 M, BSA al 3%, LDAO al 0,5%, pH 8,0). La disolución resultante se carga sobre placas de múltiples pocillos prehumedecidas (tampón de resuspensión) con revestimiento de níquel (placas Ni-NTA Hisorb, Qiagen, EEUU) y se incuba durante 1 hora, seguido de tres etapas de lavado. Una etapa de lavado incluye la adición de 200 µl de tampón de resuspensión, agitación lenta de la placa durante 5 minutos y retirada de la disolución. Para este protocolo, todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente en una placa en agitación lenta, cubierta por una lámina de aluminio.

Los anticuerpos se diluyen en tampón de resuspensión y se dejan en la placa de múltiples pocillos durante 1 hora. Primero se añade anti-PrgI (1:2000, anticuerpo anti-PrgI generado en conejos contra PrgI-his6 recombinante) y se retira por medio de tres etapas de lavado después de un tiempo de incubación de una hora. Se emplean anticuerpos acoplados con peroxidasa anti-conejo (1:10000) como anticuerpos secundarios, de nuevo se incuba durante una hora y se lavan por medio de tres etapas de lavado. La detección final se realiza añadiendo 100 µl de tetrametilbenzidina supersensible (Sigma, EEUU). En cuanto aparece un color azul marcado, la reacción se detiene empleando 20 µl de ácido sulfúrico y se mide la absorbancia a 450 nm.

En la tabla 6 se listan ejemplos de homólogos de PrgH y PrgI que pueden utilizarse para identificar inhibidores del ensamblaje de otras bacterias Gram-negativas.

Tabla 6

| Registro                 | Nombre de la entrada | Nombres de las proteínas                      | Nombres de los genes | Organismo                                              |
|--------------------------|----------------------|-----------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>Homólogos de PrgH</b> |                      |                                               |                      |                                                        |
| B2VEF8                   | B2VEF8_ERWT9         | sistema de secreción de proteínas de tipo III | prgH (ETA_19100)     | <i>Erwinia tasmaniensis</i><br>(cepa DSM 17950/Et1/99) |

ES 2 526 316 T3

|                          |              |                                                                                                                      |                        |                                                         |
|--------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------|
| Q7DB78                   | Q7DB78_ECO57 | EscD (sistema de secreción de proteínas de tipo III de EscD) (sistema de secreción de proteínas de tipo III de EscD) | escD (ECs4558) (Z5109) | <i>Escherichia coli</i> 0157:H7                         |
| P41783                   | PRGH_SALTY   | proteína prgH                                                                                                        | prgH (STM2874)         | <i>Salmonella typhimurium</i>                           |
| P0A221                   | MXIG_SHIFL   | proteína mxiG                                                                                                        | mxiG (CP0136)          | <i>Shigella flexneri</i>                                |
| Q6R8E0                   | Q6R8E0_SODGL | YsaF                                                                                                                 | ysaF                   | <i>Sodalis glossinidius</i>                             |
| A9R9J7                   | A9R9J7_YERPG | aparato de secreción de proteínas de tipo III de YscD                                                                | yscD (YpAngola_B0055)  | <i>Yersinia pestis</i> bv. <i>Antiqua</i> (cepa Angola) |
| <b>Homólogos de PrgI</b> |              |                                                                                                                      |                        |                                                         |
| B2VEF9                   | B2VEF9_ERWT9 | aparato de secreción de tipo III                                                                                     | prgI (ETA_19110)       | <i>Erwinia tasmaniensis</i> (cepa DSM 17950/Etl/99)     |
| B7N793                   | B7N793_ECOLU | sistema de secreción de proteínas de la aguja de tipo III                                                            | prgI (ECUMN_3190)      | <i>Escherichia coli</i> O17:K52:H18 (cepa UMN026/ExPEC) |
| P41784                   | PRGI_SALTY   | proteína prgI                                                                                                        | prgI (STM2873)         | <i>Salmonella typhimurium</i>                           |
| P0A223                   | MXIH_SHIFL   | proteína mxiH                                                                                                        | mxiH (CP0137)          | <i>Shigella flexneri</i>                                |
| Q6R8A5                   | Q6R8A5_SODGL | PrgI                                                                                                                 | prgI                   | <i>Sodalis glossinidius</i>                             |
| Q01247                   | YSCF_YEREN   | proteína F de translocación de proteínas Yop                                                                         | yscF                   | <i>Yersinia enterocolitica</i>                          |
| <b>Homólogos de InvG</b> |              |                                                                                                                      |                        |                                                         |
| B2VEF5                   | B2VEF5_ERWT9 | aparato de secreción de tipo III                                                                                     | invG (ETA 19080)       | <i>Erwinia tasmaniensis</i> (cepa DSM 17950/Etl/99)     |
| B7UMB3                   | B7UMB3_ECO27 | proteína de estructura de T3SS de EscC                                                                               | escC (E2348_C_3955)    | <i>Escherichia coli</i> O127:H6 (cepa E2348/69/EPEC)    |
| P35672                   | INVG_SALTY   | proteína invG                                                                                                        | invG (STM2898)         | <i>Salmonella typhimurium</i>                           |
| Q04641                   | MXID_SHIFL   | proteína de la membrana externa mxiD                                                                                 | mxiD (CP0145)          | <i>Shigella flexneri</i>                                |
| Q6R8B7                   | Q6R8B7_SODGL | InvG                                                                                                                 | invG                   | <i>Sodalis glossinidius</i>                             |
| Q7BRZ9                   | Q7BRZ9_YEREN | secretina de YscC                                                                                                    | yscC                   | <i>Yersinia enterocolitica</i>                          |

**Ejemplo 3 - Inmunodetección de los translocadores SipB y SipC (transferencia Western)**

Se cultiva *Salmonella typhimurium* bajo condiciones que estimulan la formación del complejo de la aguja, con un precultivo no inducido durante la noche, seguido de 5 a 10 horas de crecimiento inducido, o con inoculación directa y crecimiento durante la noche en LB líquido (NaCl 0,3 M, arabinosa al 0,012%, antibióticos adecuados), ambos a 37 °C.

Se eliminan las células del cultivo mediante centrifugación en tubos. El sobrenadante del cultivo principal se hace pasar a través de un filtro de 0,45 µm. Se añaden 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA, disolución madre al 100% en p/v) a 10 ml de la muestra de proteínas y se conserva a 4 °C durante al menos 60 min. Para las siguientes etapas, las centrifugas se enfrían hasta por debajo de 0 °C. Se emplea acetona para lavar. La muestra se conserva a 18 °C y se mantiene en hielo en el laboratorio.

El precipitado se sedimenta mediante centrifugación en tubos Falcon a 8000 rpm durante 40 min, el sobrenadante se retira cuidadosamente y se rechaza, y el sedimento se lava con 1,8 ml de acetona fría. La muestra después se transfiere a tubos de plástico de 2 ml y se conserva a 20 °C. Las proteínas se sedimentan en una centrifuga de mesa refrigerada a la velocidad máxima (13 krpm, 10 min), el sobrenadante se retira y se añaden 1,8 ml de acetona fría (-20 °C). Se repite la última etapa, el sobrenadante se retira y el sedimento se seca en un bloque calefactor ajustado a 95 °C durante unos pocos minutos. El sedimento se resuspende en 40 µl de H<sub>2</sub>O y 60 µl de 5x tampón de muestra Lamml. La muestra se calienta hasta 98 °C durante 5 min sobre un bloque calefactor antes de cargarla sobre un gel de poliacrilamida.

El gel de poliacrilamida con las muestras de proteínas separadas se lava colocándolo en un recipiente de plástico con 100 ml de H<sub>2</sub>O y se agita con suavidad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después el H<sub>2</sub>O se reemplaza por tampón de transferencia de proteínas (PTB: 2,9 g de glicina, 5,8 de de base Tris, 0,37 g de dodecilsulfato de sodio, 200 ml de metanol, en 800 ml de dH<sub>2</sub>O), y se deja sumergido durante 10 minutos más.

Se corta una membrana de PVDF (Millipore, Billerica, EEUU) y una cantidad adecuada de papel de filtro (2x tres capas de papel de filtro Whatman® 3MM Chr) a un tamaño adecuado. La membrana se activa humedeciéndola con metanol al 100%, después se lava durante 5 minutos en dH<sub>2</sub>O, seguido de 10 minutos de equilibrio en 1x PTB. El papel de filtro se humedece empleando 1x PTB. La transferencia de proteínas desde el gel a la membrana se realiza utilizando Bio-Rads Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell. Después de la transferencia, la membrana se coloca cuidadosamente en un recipiente de plástico adecuado, en el que se realizan todas las etapas de incubación mientras se agita lentamente.

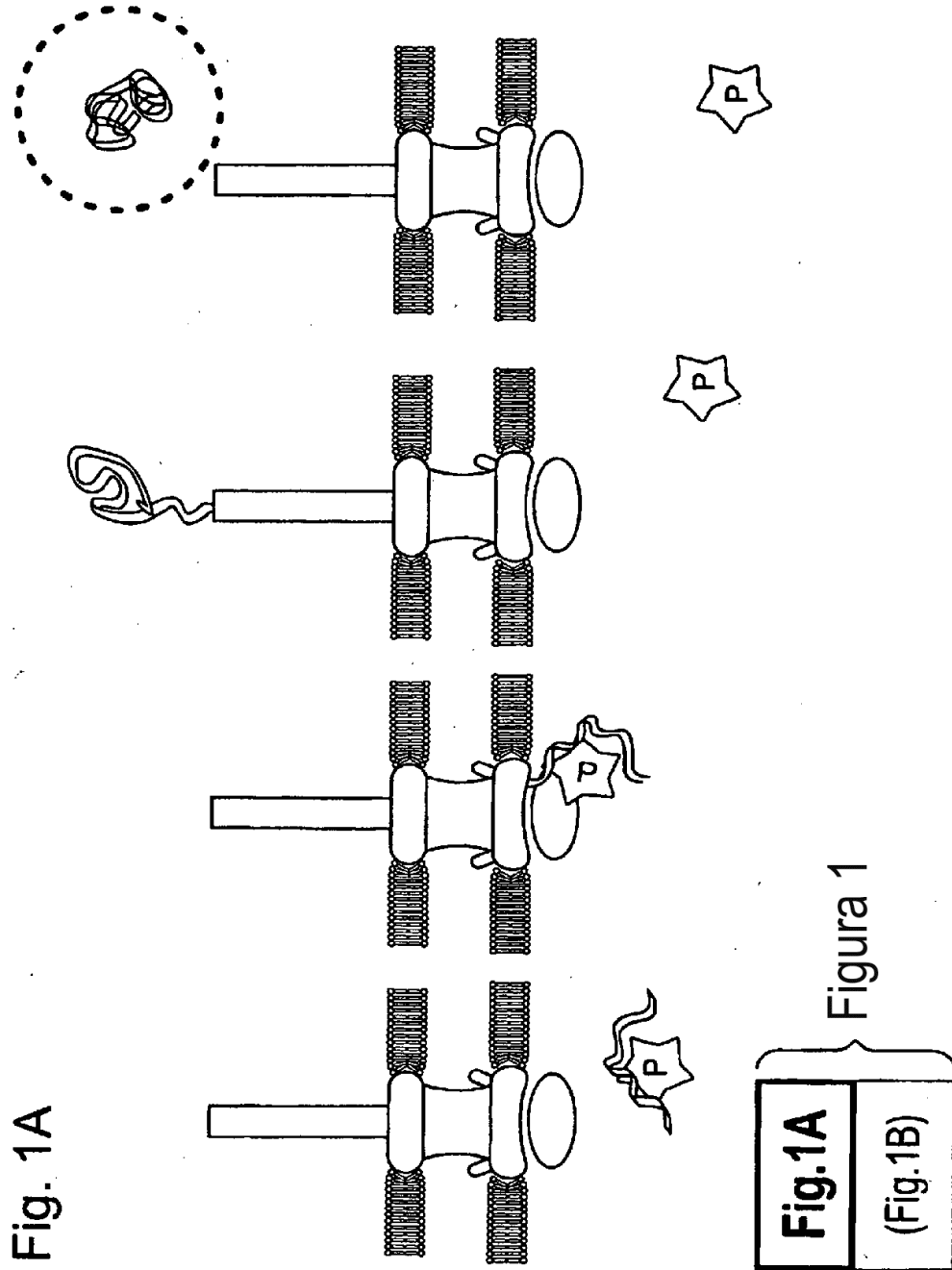
Otros sitios de unión se bloquean empapando la membrana en leche desnatada en polvo al 5% disuelta en Tween 20 al 0,1% en PBS (PBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. La membrana se enjuaga dos veces con PBS-T y después se coloca en una dilución del anticuerpo de detección primario en PBS-T (anti-SipB 1:10000, generado en conejos contra SipB recombinante, anti-SipC 1:1000 generado en conejos contra SipC recombinante). La membrana se incuba durante una hora a temperatura ambiente, o durante la noche a 4 °C. Se realizan dos etapas de enjuagado y tres etapas de lavado, que duran cada una 5 minutos en PBS-T, antes de añadir una dilución del anticuerpo secundario (antirratón 1:10000 en PBS-T) durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. De nuevo se enjuaga la membrana y se lava tres veces antes de aplicar los reactivos de detección (reactivos de detección de transferencia Western Amersham™ ECL, GE Healthcare, EEUU). Se retira cuidadosamente el exceso de líquido y se pipetea 1 ml de reactivo de detección y se extiende sobre cada membrana. Después de un minuto de incubación, la membrana se coloca en una película transparente, después en un módulo de rayos X, y la banda de proteína puede detectarse mediante la exposición de la película (Amersham™ Hyperfilm™, GE Healthcare, EEUU) durante 10 segundos a 30 minutos. La película expuesta se revela empleando un revelador de película Colenta MP 900 F. La identificación de las proteínas individuales se realiza mediante espectroscopía de masas. Se detectan SipB y Sipc. Esto demuestra que T3SS es funcional bajo las condiciones de cultivo elegidas. Si el cultivo se realiza bajo las mismas condiciones y en presencia de un inhibidor de la funcionalidad de T3SS, no se detectan SipB y/o SipC.

De una manera análoga, pueden detectarse moléculas efectoras que no tienen una chaperona.

En lugar de emplear una transferencia Western, para el formato HTS, se realiza un AlphaLISA de tipo sándwich de la siguiente forma: un anticuerpo anti-SipB (o un anticuerpo anti-SipC, respectivamente) se biotinila y se captura mediante una esfera donante revestida con estreptavidina. Un segundo anticuerpo anti-SipB (o anticuerpo anti-SipC, respectivamente) se acopla a la esfera aceptora. La presencia de SipB (o SipC, respectivamente) produce un inmunosándwich, haciendo que las esferas donante y aceptora se pongan en proximidad cercana, lo cual produce una señal mensurable.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para determinar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de inhibir la función del sistema de secreción de tipo 3 T3SS, en el que un compuesto de ensayo se pone en contacto con células bacterianas que tiene un T3SS, y se ensaya:
  - 5 a. en una primera etapa, su capacidad para inhibir la secreción de una proteína efectora en dichas células bacterianas determinando la cantidad de una proteína efectora secretada debido a su unión a su molécula de chaperona cognada, en el que una cantidad reducida de proteína efectora unida a dicha chaperona, comparada con la cantidad en una muestra control procedente de células que no han sido tratadas con dicho compuesto de ensayo, es indicativa de un efecto inhibitor de dicho compuesto sobre la secreción de dicha proteína efectora, y
  - 10 b. en una segunda etapa, su capacidad para inhibir el ensamblaje de los componentes estructurales para formar el complejo de la aguja de T3SS.
- 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el efector se selecciona de SptP y SipA-Flag, y la chaperona se selecciona de SicP e InvB, respectivamente.
- 3.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la cantidad de proteína efectora o translocadora secretada se determina mediante un ELISA.
  - 15 4.- El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el ELISA se convierte en un ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado, y se ensaya en el formato de alta capacidad de procesamiento.
  - 5.- Un procedimiento para controlar el ensamblaje de los componentes estructurales para formar el complejo de la aguja de T3SS, en el que el ensamblaje del complejo de la aguja se determina detectando un componente estructural unido por láser [x] cuando está asociado con un componente estructural preexistente [x-1], o con un complejo preformado que contiene el componente [x-1], respectivamente.
    - 20 6.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en dicha segunda etapa, el ensamblaje del complejo de la aguja se determina detectando un componente estructural unido por láser [x] cuando está asociado con un componente estructural preexistente [x-1], o con un complejo preformado que contiene el componente [x-1], respectivamente.
    - 25 7.- El procedimiento de la reivindicación 5 o 6, en el que la unión del componente [x-1] al componente [x] se determina mediante un ELISA, en el que el componente [x-1] o un complejo que lo contenga se conjuga sobre un soporte sólido, y el componente [x] se detecta cuando está unido a [x-1].
    - 30 8.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que PrgI de *Salmonella typhimurium*, o uno de sus homólogos procedente de otra bacteria Gram-negativa, es el componente [x], y en el que PrgH de *Salmonella typhimurium*, o uno de sus homólogos procedente de otra bacteria Gram-negativa, es el componente [x-1].



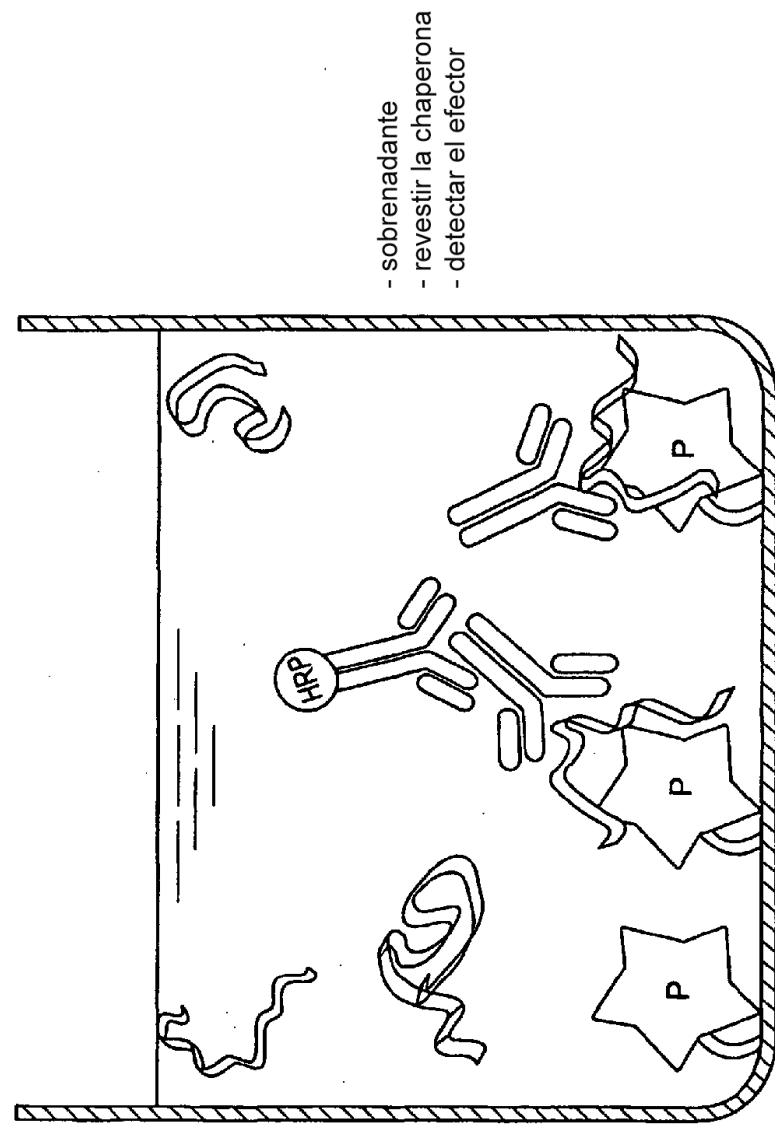
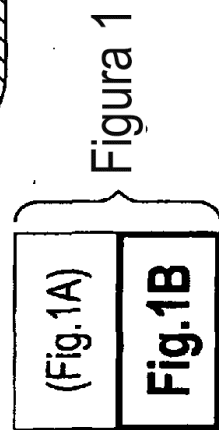


Fig. 1B



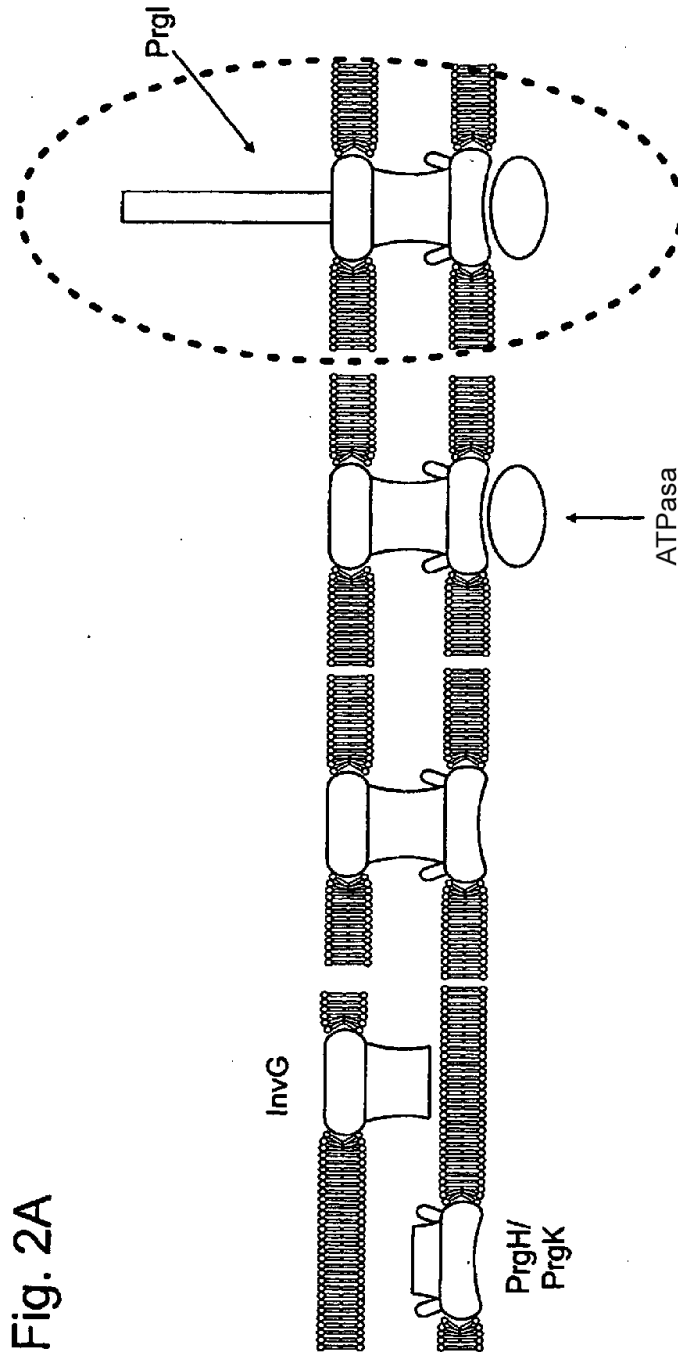


Fig. 2A

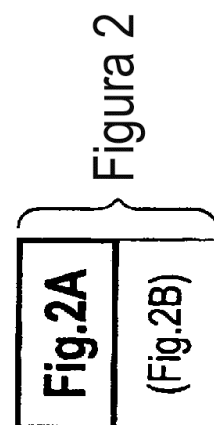
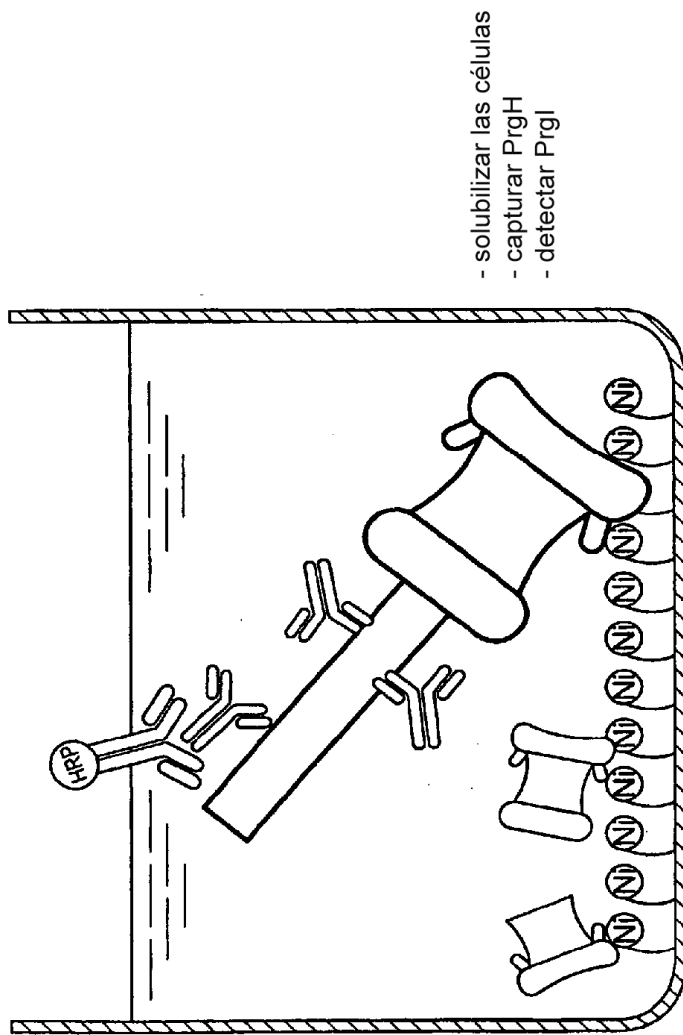


Fig. 2B



|               |          |
|---------------|----------|
| (Fig.2A)      | Figura 2 |
| <b>Fig.2B</b> |          |