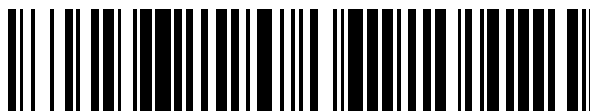


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 728**

51 Int. Cl.:

C07K 14/295 (2006.01)

A61K 39/118 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2011 PCT/EP2011/058755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11147975**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11722068 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2576602**

54 Título: **Antígeno de la MOMP quimérica, método y uso**

30 Prioridad:

28.05.2010 SE 1050535

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

22.10.2020

73 Titular/es:

**SPIXIA BIOTECHNOLOGY AB (100.0%)
C/o Strid, Östra Vintergatan 48, lgh 1203
70343 Örebro, SE**

72 Inventor/es:

**ANDERSSON, SÖREN y
STRID, ÅKE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 788 728 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

Antígeno de la MOMP quimérica, método y uso

5 Campo técnico

Esta invención concierne, en general, al campo de los polipéptidos con capacidad de suscitar una respuesta inmunológica que es protectora contra *Chlamydia trachomatis*. Más particularmente, la invención se refiere a la producción de estos polipéptidos y a composiciones farmacéuticas que los comprenden.

10

Antecedentes

Se sabe que una de las proteínas que forman el complejo de la membrana externa de *Chlamydia trachomatis*, la proteína de la membrana externa principal (MOMP, siglas del inglés *major outer membrane protein*), es capaz de inducir respuestas tanto de linfocitos T como de anticuerpos neutralizantes contra la infección por clamidia en mamíferos, tal como en seres humanos. En la figura 1 se muestra una vista general esquemática de la proteína MOMP, adaptada de Findlay HE, McClafferty H y Ashley RH (2005) Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. BMC Microbiology 5, 5, un artículo en el que se explica la topología de la proteína MOMP. En la figura 1, la A indica la membrana celular y la B la superficie externa de la membrana celular.

15

20

El uso de la proteína MOMP total como una vacuna contra *Chlamydia trachomatis* se ha desvelado en el documento WO 2008/040757 A1.

25

Las regiones inmunogénicas de MOMP de *C. trachomatis*, así como las principales regiones inmunogénicas de la serovariedad (variedad serológica) E, se describen en Ortiz et al., Infection and Immunity, marzo de 2000, págs. 1719-1723.

30

Sin embargo, los experimentos con animales han demostrado un éxito muy limitado de las vacunas contra clamidia de la subunidad MOMP. Asimismo, la producción de la proteína MOMP completa es tediosa y costosa, sin mencionar que se limita a determinados métodos de producción específicos.

35

Para superar la deficiencia mencionada anteriormente, se ha sugerido el uso de péptidos sintéticos, que combinan epítopos específicos de *Chlamydia trachomatis*, cuyos epítopos desencadenan una respuesta inmunitaria.

40

Sin embargo, puede que dichos epítopos aislados no sean funcionales en un contexto sintético y, por tanto, no proporcionen el efecto deseado.

Por lo tanto, sería ventajoso disponer de un polipéptido mejorado para producir una respuesta inmunitaria que proteja contra *Chlamydia trachomatis* y, en particular, de un polipéptido que permita mayor flexibilidad, rentabilidad, sencillez de producción y purificación con un efecto inmunológico conservado o mejorado.

Sumario

45

Por consiguiente, la presente invención busca, preferentemente, mitigar, aliviar o eliminar una o más de las deficiencias y desventajas, identificadas anteriormente en la técnica, individualmente o en cualquier combinación y resuelve al menos los problemas mencionados anteriormente proporcionando un polipéptido según las reivindicaciones de patente adjuntas.

50

La solución general según la invención, es proporcionar un polipéptido que sea fácil de producir y purificar, pero que conserve la capacidad de producir una respuesta inmunitaria contra *Chlamydia trachomatis*.

55

Por tanto, según un primer aspecto, se proporciona un polipéptido. Dicho polipéptido comprende una primera secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 y una segunda secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, en donde dichas primera y segunda secuencias de aminoácidos, están separadas por menos de 30 restos de aminoácidos, y en donde la primera secuencia de aminoácidos y la segunda secuencia de aminoácidos están separadas por un enlazador según la SEC ID NO: 20 o la SEC ID NO: 26. Cada una de dichas primera y segunda secuencias de aminoácidos comprende epítopos para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno que es protectora contra *Chlamydia trachomatis*, y una parte de la membrana que abarca parte de la proteína de la membrana externa principal (MOMP) de *Chlamydia trachomatis*. En conjunto, la primera y segunda secuencias de aminoácidos comprenden aproximadamente 25 epítopos, que pueden estimular tanto la respuesta de los linfocitos T (CD4+ y CD8+) como la respuesta de los linfocitos B. Una ventaja de esto es que el polipéptido es más fácil de producir en forma purificada en comparación con la proteína MOMP completa, al mismo tiempo que sigue suscitando una respuesta inmunológica aceptable. Una ventaja de los polipéptidos, comprendiendo cada uno de ellos una parte de la membrana que abarca la parte de MOMP, es que se conserva la estructura tridimensional de los epítopos, dado que, como se ilustra en la figura 14, las dos partes que abarcan la membrana pueden interactuar para formar una estructura

60

65

- 5 hidrófoba. Otra ventaja del polipéptido que comprende una parte de la membrana que abarca parte de MOMP, es que durante la producción los epítomos se conservan. Una ventaja adicional de esto, es que proporciona la posibilidad de que haya una interacción hidrófoba entre las dos partes de la quimera, lo que a su vez proporciona un dominio tridimensional que podría imitar las características antigénicas de la proteína MOMP completa. Por tanto, eliminando la mayor parte de la membrana de la proteína MOMP del polipéptido según el primer aspecto, se obtiene un polipéptido que es más fácil de manipular que la MOMP de tipo silvestre; y al mantener simultáneamente partes mínimas de las hélices de membrana, seleccionadas específicamente, en los extremos de las secuencias, se obtiene un polipéptido que es más estable y que puede ser más eficaz que las secuencias artificiales más cortas.
- 10 A la vez, el polipéptido proporciona un péptido sintético alternativo basado en la proteína MOMP que es antigénico y adecuado para su uso como vacuna.
- 15 Específicamente, el polipéptido puede permitir conservar o mejorar la antigenicidad en comparación con secuencias artificiales más cortas con solo dos epítomos ligados, al mismo tiempo que es fácil de producir y purificar en comparación con MOMP de tipo silvestre.
- El polipéptido tiene una longitud entre 116 y 117 aminoácidos. Una ventaja de esto es que el polipéptido es más fácil de expresar.
- 20 La primera secuencia de aminoácidos y la segunda secuencia de aminoácidos están separadas por un enlazador según la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 26.
- 25 Esto supone una ventaja, ya que el enlazador, según la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 26, es flexible, lo que significa que proporciona una posibilidad de interacción aleatoria entre las dos partes de la quimera, aumentando la probabilidad de que se forme una estructura tridimensional que el sistema inmunitario podría reconocer, sin bloquear la proteína en una conformación desfavorable.
- 30 Otra ventaja de un enlazador flexible es que proporciona la oportunidad de que las dos partes del polipéptido interactúen a la vez con diferentes partes del sistema inmunitario, ya que pueden moverse una con respecto a la otra, como se ilustra en la figura 15.
- Para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno, que sea protectora contra *Chlamydia trachomatis*, los epítomos se conservan en varias serovariedades de *Chlamydia trachomatis*.
- 35 Esto supone una ventaja, ya que permite una respuesta protectora contra más de una serovariedad de *Chlamydia trachomatis*.
- En una realización, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 3.
- 40 En una realización, el polipéptido se fusiona con una secuencia de aminoácidos que comprende una etiqueta de His según la SEQ ID NO: 5 o una etiqueta de V5 según la SEQ ID NO: 4.
- Una ventaja de esto es que el polipéptido es más fácil de purificar.
- 45 En una realización, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6.
- Según un segundo aspecto, se proporciona un compuesto que comprende la secuencia de aminoácidos según el primer aspecto.
- 50 Según un tercer aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido según el primer aspecto.
- En una realización, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácidos nucleicos según la SEQ ID NO: 9.
- 55 Según un cuarto aspecto, se proporciona un plásmido que comprende el ácido nucleico según el tercer aspecto.
- El plásmido puede usarse como un vector de expresión.
- 60 Según un quinto aspecto, se proporciona una célula transformada con un vector de expresión, en donde el vector de expresión es un plásmido según el cuarto aspecto, eligiéndose la célula del grupo que consiste en una célula vegetal, una bacteria, una célula de levadura, una célula fúngica, una célula de insecto o una célula de mamífero.
- Según un sexto aspecto, se proporciona un proceso para producir un polipéptido según el primer aspecto, cuyo proceso comprende cultivar una célula según el quinto aspecto y recuperar el polipéptido.
- 65 Una composición puede comprender un polipéptido según el primer aspecto junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Dicha composición puede comprender además un adyuvante, tal como adyuvante de toxina del cólera (TC).

5 Según un séptimo aspecto, se proporciona un polipéptido según el primer aspecto o un compuesto según el segundo aspecto para uso como medicamento.

10 Según un octavo aspecto, se proporciona un polipéptido según el primer aspecto, o un compuesto según el segundo aspecto, para su uso como una vacuna contra *Chlamydia trachomatis*, o para su uso para impedir la infertilidad como resultado de una infección con *Chlamydia trachomatis*.

Dicho polipéptido según el primer aspecto, o dicho compuesto según el segundo aspecto, puede administrarse por vía oral, parenteral, mediante pulverización por inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, sublingual o vaginal.

15 En una realización, el polipéptido se administra por vía nasal.

Por tanto, la administración puede ser administración nasal. La administración nasal puede ser por pulverización nasal o gotas nasales.

20 La presente invención tiene la ventaja sobre la técnica anterior de que es más fácil de producir, con un efecto inmunológico conservado o mejorado, que a su vez permite vías de administración más flexibles.

La presente invención también tiene la ventaja de que es más fácil de purificar en forma soluble y tiene una mayor estabilidad en solución.

25 Breve descripción de los dibujos

Estos y otros aspectos, características y ventajas de la invención, resultarán obvios y se explicarán a partir de la siguiente Descripción de las realizaciones de la presente invención, haciendo referencia a los dibujos que la acompañan, en los que

30 la figura 1 es una ilustración esquemática de la proteína MOMP de TS (tipo silvestre);
 la figura 2 es una imagen del resultado de un análisis de PCR de una construcción génica según una realización;
 la figura 3 es una imagen del resultado de un análisis de transferencia Western de un polipéptido según una
 35 realización;
 la figura 4 es una imagen de una tinción con azul de Coomassie de la proteína MOMP purificada según una
 realización;
 la figura 5 es una imagen de los resultados de un análisis de transferencia Western de un polipéptido según otra
 realización;
 40 la figura 6 es una imagen del resultado de un análisis de transferencia Southern de ADN genómico transformado
 según una realización;
 la figura 7 es una imagen del resultado de una semicuantificación del polipéptido según una realización adicional;
 las figuras 8 y 9 son diagramas que muestran los resultados de experimentos de inmunización según algunas
 realizaciones;
 45 la figura 10 es un gráfico que muestra el efecto protector de la inmunización según una realización, en ratones;
 la figura 11 es un diagrama que muestra los resultados de un experimento de inmunización según una realización;
 la figura 12 es un gráfico que muestra el efecto protector de la inmunización según una realización, en ratones;
 la figura 13 es un gráfico que muestra el efecto de prohibición de la inmunización según una realización, en ratones;
 la figura 14 es una vista general esquemática de las partes que abarcan la membrana según una realización,
 interactuando para formar una estructura hidrófoba; y
 50 la figura 15 es una vista general esquemática de las dos partes del polipéptido según una realización, que se
 mueven una con respecto a la otra.

Descripción de las realizaciones

55 A continuación se describirán varias realizaciones de la presente invención con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos para que los expertos en la materia puedan llevar a cabo la invención. Sin embargo, la invención puede representarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. Más bien, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta divulgación será exhaustiva y completa y transmitirá plenamente el alcance de la invención para los expertos en la técnica. Las realizaciones no limitan la invención, aunque la invención solo está limitada por las reivindicaciones de patente adjuntas. Asimismo, la terminología utilizada en la descripción detallada de las realizaciones particulares ilustradas en los dibujos adjuntos no pretende limitar la invención.

65 La siguiente descripción se centra en una realización de la presente invención que es aplicable a un polipéptido para producir una respuesta inmunitaria que es protectora contra *Chlamydia trachomatis*, y en particular, a un polipéptido químico, basado en el polipéptido de la serovariedad E del polipéptido de MOMP de *C. trachomatis*, para producir

una respuesta inmunitaria que proteja contra *Chlamydia trachomatis*. Sin embargo, se apreciará que la divulgación no se limita a esta solicitud, sino que puede aplicarse a muchas otras serovariedades, incluyendo, por ejemplo, las serovariedades A a K, Ba, Da, Ia, Ja, L1 a L3 y L2a.

5 Los presentes inventores han descubierto un polipéptido quimérico, basado en la proteína MOMP, que actúa como un antígeno para la inmunización contra *Chlamydia trachomatis*, y aun así es fácil de purificar, debido a su tamaño relativamente pequeño y a su reducida hidrofobicidad en comparación con la proteína MOMP de TS.

10 Como se mostrará con mayor detalle a continuación, el polipéptido puede expresarse en una variedad de hospedadores, tales como *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana* y *Daucus carota*. Sin embargo, para la expresión, puede utilizarse cualquier tipo de hospedador, tal como una célula bacteriana, fúngica, vegetal, de insecto o de mamífero. El polipéptido o la quimera de MOMP, que comprende dos bucles de la proteína MOMP de TS, es más soluble en agua que la proteína de TS y está optimizado con respecto a la antigenicidad ya que incluye epítomos estimuladores de linfocitos T y B, lo cual es importante para el efecto inmunológico. Asimismo, es más fácil de purificar y más estable.

15 El polipéptido puede administrarse a un sujeto mediante cualquier medio conocido por un experto en la materia. Por ejemplo, la administración a seres humanos o animales puede ser local o sistémica y llevarse a cabo por vía oral, parenteral, mediante pulverización por inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, o mediante un depósito implantado. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal e intraósea y técnicas de infusión.

20 En una realización, también se proporciona una composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz de al menos un polipéptido según algunas realizaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede formularse en forma de sólido, líquido, gel o suspensión para: administración oral, tal como, por ejemplo, en forma de comprimido (por ejemplo, específicos para absorción bucal, sublingual o sistémica), en embolada, en polvo, en gránulo, pasta o gel, para aplicación en la lengua, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina blanda, pulverizador bucal, emulsión y microemulsión; administración parenteral mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural, tal como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril; una aplicación tópica, tal como, por ejemplo, una crema, una pomada, un parche o un pulverizador aplicado en la piel; administración intravaginal o intrarrectal, tal como, por ejemplo, un pesario, una crema o una espuma; administración sublingual; administración ocular; administración transdérmica; o administración nasal, tal como un pulverizador nasal, o gotas nasales.

25 En una realización, el polipéptido puede administrarse por vía oral a un sujeto, tal como, un ratón o un ser humano. En otra realización, el polipéptido puede administrarse por vía nasal a un sujeto, tal como, un ratón o un ser humano. La administración nasal puede ser mediante pulverización o gotas. En otra realización más, el polipéptido puede administrarse por vía parenteral a un sujeto, tal como, un ratón o un ser humano.

30 Los presentes inventores descubrieron una construcción con epítomos según una realización, importante para linfocitos T CD4⁺, linfocitos T citotóxicos (CTL, siglas del inglés *cytotoxic T lymphocytes*), así como anticuerpos neutralizantes, que son necesarios para generar una respuesta inmunoprotectora contra *Chlamydia trachomatis*. Esta nueva proteína indujo una respuesta inmunogénica, así como un efecto protector en ratones.

35 El tipo y la cantidad de restos de aminoácidos que separan los epítomos, es decir, que separan la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, pueden seleccionarse de manera que, como se sabe en la técnica, el polipéptido se purifique fácilmente, la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente se exprese convenientemente en el tipo de célula deseado y/o el polipéptido pueda administrarse en una formulación deseable. Preferentemente, esta selección se realiza de tal manera que la capacidad del polipéptido para producir una respuesta inmunitaria contra *Chlamydia trachomatis* se mantenga alta, o al menos a un nivel aceptable.

40 La construcción diseñada se transfirió con éxito al genoma de *Arabidopsis thaliana* y la integración estable del transgén se manifestó durante al menos seis generaciones, lo cual se demostró mediante análisis de inmunotransferencia. Esto supone una ventaja, dado que la estabilidad del transgén en la descendencia es importante para futuras posibilidades de aumentar la producción de plantas transgénicas. Dado que los ratones consumen *A. thaliana* cruda, esto puede funcionar como un sistema modelo en ensayos preclínicos.

45 Otras ventajas de la utilización de plantas transgénicas comestibles para la vacunación, son la sencillez del suministro, la rentabilidad y las posibilidades de producción local. Por otra parte, las vacunas producidas de esta manera son inocuas y no infecciosas y abren la posibilidad de proporcionar una alta frecuencia de refuerzos. La mejora de los protocolos de administración y el uso de adyuvantes durante la vacunación oral pueden aumentar la eficacia de las vacunas comestibles.

50 Las vacunas comestibles de origen vegetal, son buenas candidatas para dicha inmunización. Son inocuas, asequibles y pueden cultivarse localmente. Además, las plantas transgénicas son capaces de producir diversos antígenos

diferentes al cruzar plantas que producen diferentes productos. Se sabe que las plantas transgénicas pueden estimular una respuesta inmunitaria bidireccional, tanto sistémica como mucosa.

5 Asimismo, la construcción diseñada se transfirió con éxito a *Escherichia coli*. Esto supone una ventaja, ya que *E. coli* es una bacteria muy conocida y un hospedador habitualmente utilizado para la producción de proteínas.

En una realización, el polipéptido está ligado a una etiqueta de expresión, tal como una etiqueta de V5 y/o de His. Esto supone una ventaja, porque simplifica la producción y purificación del polipéptido.

10 Descripción detallada de las realizaciones

Lo siguiente es una Descripción detallada de las realizaciones. Se proporciona solo con fines ilustrativos, para que un experto en la materia pueda hacer y usar la invención. Sin embargo, no debe interpretarse como limitante de ninguna manera.

15 Construcción de la MOMP quimérica

A partir de una suspensión bacteriana proveniente de un paciente infectado con la serovariedad E de *Chlamydia trachomatis* (Hospital Universitario de Orebro, Suecia) y utilizando el Mini Kit de ADN QIAamp® (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante, se aisló ADN genómico total. La amplificación inicial de dos fragmentos de ADN (como se ilustra en la figura 1 en las partes VS2 y VS4 similares) de la MOMP de *Chlamydia trachomatis* que contiene diversos epítomos elegidos de linfocitos B y T, se realizó a partir de ADN genómico preparado usando cebadores según las SEC ID NO: 10 a 13 (cebador directo 1 de VS2, cebador inverso 1 de VS2, cebador directo 1 de VS4 y cebador inverso 1 de VS4, respectivamente). En las reacciones de PCR se utilizó *Ex Taq* ADN polimerasa (Takara Bio Inc, Shiga, Japón) y consistió en 35 ciclos de 98°C (10 segundos), 55°C (30 segundos) y 72°C (1 min) seguido de extensión a 72°C (15 min). Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación QIAquickPCR (Qiagen, Hilden, Alemania) y se sometieron a una segunda PCR realizada en las mismas condiciones que la primera PCR con cebadores según las SEC ID NO: 14 a 15 (cebador directo 2 y 3 de VS2 y cebador inverso 2 de VS2, respectivamente) para el fragmento VS2 extendido y las SEQ ID NO: 16 a 17 (cebador directo 2 de VS4 y cebador inverso 2 y 3 de VS4, respectivamente) para el fragmento VS4 extendido. Los cebadores de PCR para amplificar los fragmentos VS2 y VS4 con la adición de la secuencia enlazadora [(Gly₄Ser)₃], según la SEQ ID NO: 20, o la secuencia enlazadora [(Gly₄Ser)₂Gly₄] según la SEQ ID NO: 26, se diseñaron basándose en las secuencias de nucleótidos del enlazador y en los fragmentos de MOMP elegidos. Los fragmentos purificados se proporcionan como SEQ ID NO: 1 y 2, y son similares a los fragmentos VS2 y VS4 según la figura 1. Los fragmentos purificados se cortaron y empalmaron por extensión superpuesta, como sabe un experto en la técnica, utilizando las siguientes condiciones: 10 ciclos de 95°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (2 min), seguido de extensión a 72°C durante 15 min. El producto cortado y empalmado se usó para una tercera PCR en la que se utilizó Pfx Taq-polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 25 ciclos de 94°C (15 seg), 55°C (30 seg), 72°C (2 min) seguido de una sola etapa de extensión a 72°C (30 min). La amplificación se realizó con los cebadores de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 17. El producto de PCR obtenido según la SEQ ID NO: 9 se purificó como se ha descrito anteriormente.

Los fragmentos purificados, SEQ ID NO: 1 y 2, comprenden epítomos para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno que protege contra *Chlamydia trachomatis*, y partes de la membrana que abarca parte de la proteína de la membrana externa principal (MOMP) de *Chlamydia trachomatis*. La parte que abarca la membrana de la SEQ ID NO: 1 está representada por los números de aminoácidos 22 a 27 y las partes que abarcan la membrana de la SEQ ID NO: 2 están representadas por los números de aminoácidos 3 a 9 y 17 a 23, respectivamente. Una ventaja de usar solo fragmentos de MOMP es que el polipéptido es más fácil de producir en forma purificada en comparación con la proteína MOMP completa. Una ventaja del polipéptido que comprende partes de la membrana que abarca parte de la MOMP, es que se conserva la estructura tridimensional de los epítomos. Otra ventaja del polipéptido que comprende partes de la membrana que abarca parte de la MOMP, es que durante la producción, los epítomos se conservan en la construcción. Una ventaja adicional de esto, es que proporciona la posibilidad de que haya una interacción hidrófoba entre las dos partes de la quimera, lo que a su vez proporciona un dominio tridimensional que podría imitar las características antigénicas de la proteína MOMP completa.

55 Se cree que la parte que abarca la membrana es una conformación helicoidal.

Cada uno de los fragmentos, es decir, las SEQ ID NO: 1 y 2, comprende dos hélices.

60 Esto supone una ventaja, ya que además mejora las ventajas mencionadas anteriormente.

A la vez, el polipéptido permite conservar o mejorar la antigenicidad, siendo al mismo tiempo fácil de producir y purificar.

Para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno, que sea protectora contra *Chlamydia trachomatis*, los epítomos se conservan en varias serovariedades de *Chlamydia trachomatis*.

65 Esto supone una ventaja, ya que permite una respuesta protectora contra más de una serovariedad de *Chlamydia*

trachomatis.

Clonación y expresión de la quimera de MOMP en *E. coli*

5 La quimera de MOMP purificada, se clonó en el vector pET 101/D-TOPO® usando el kit de expresión direccional TOPO® Champion pET (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) según el protocolo del fabricante. La confirmación de que nuestra construcción estaba en fase con las etiquetas de fusión V5 y 6xHis en el extremo C, se realizó mediante secuenciación (ABI PRISM 310 GeneticAnalyser, Applied Biosystems, Foster City, CA). La proteína quimérica se expresó en la cepa BL21 Star™ (DE3) de *E. coli*. Un volumen de 1 000 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y betaína 2,5 mM (Sigma, Steinheim, Alemania), se inoculó con 10 ml de un cultivo nocturno reciente procedente de una sola colonia de *E. coli* y se dejó crecer a 37°C a una densidad óptica (DO) de 0,72 a 600 nm. Se añadió isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) a una concentración final de 0,15 mM, y el cultivo se incubó durante 4 horas más. Las bacterias se recogieron por centrifugación (5 000 xg, 15 min) y se sometieron a purificación de proteínas según el protocolo de Sigma-Aldrich en resina de Ni-NTA.

Purificación de la quimera de MOMP

15 El sedimento bacteriano se resuspendió en tampón de lisis (fosfato de potasio 50 mM, pH 7,8, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, glicerol al 10 %, Triton X-100 al 0,5 %, L-histidina 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM), congelado en nitrógeno líquido y después descongelado a 42°C. Para facilitar la lisis, la congelación y descongelación se repitieron 3 veces seguido de ultrasonido en hielo (35 W, 6 x 30 segundos). Después de la ultracentrifugación (45 000 xg, 45 min) se obtuvieron dos fracciones - una fracción soluble y una fracción insoluble. La fracción soluble se sometió a purificación en condiciones naturales usando Gel HIS- Select Nickel Affinity (Sigma, Saint Louis, Missouri) según el protocolo del fabricante. El sedimento se resuspendió en fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0, urea 8 M y se sometió a ultrasonido como se describió anteriormente. El material insoluble se eliminó por ultracentrifugación (50 000 xg, 60 min). El sobrenadante se sometió a purificación por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados en condiciones desnaturizantes según las recomendaciones del fabricante. Las fracciones recogidas de la proteína eluida se agruparon entre sí (por separado para la proteína natural y para la proteína desnaturizada) y se concentraron mediante un dispositivo de filtro centrífugo Amicon Ultra con un límite de peso molecular de 10 kDa (Millipore, Billerica, MA).

Construcción de ADN para la transformación de plantas

35 La MOMP quimérica se volvió a amplificar a partir de la construcción obtenida anteriormente usando los cebadores de SEQ ID NO: 14 y 18 (con el codón de terminación (*STOP*) introducido en el cebador según la SEQ ID NO: 18) y la Pfx Taq-polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) para producir un producto de PCR de extremo romo. La PCR se llevó a cabo usando las siguientes condiciones: 35 ciclos a 94°C 15 seg, 55°C 30 seg, 72°C 2min seguido de una sola etapa de extensión a 72°C durante 30 min. El producto de PCR se purificó como se ha descrito anteriormente y se usó para la subclonación en un vector de expresión de plantas.

40 Como vector de expresión de plantas se utilizó pGreen0229 (www.pgreen.ac.uk) amablemente proporcionado por el Dr. P. Mullineaux y el Dr. R. Hellens, John Innes Centre and the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (Norwich Research Park, RU). El casete de expresión contenía el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV*, siglas del inglés *Cauliflower mosaic virus*) y secuencias terminadoras de poliA del *CaMV*, separados por un sitio de clonación múltiple. El vector se linealizó con la enzima *SmaI* en el sitio de clonación múltiple y se utilizó para la clonación de la construcción de la MOMP quimérica. El plásmido resultante se verificó mediante secuenciación para confirmar la orientación correcta del inserto (ABI PRISM 310 GeneticAnalyser, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Transformación de plantas en *Arabidopsis thaliana*

50 Para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (cepa EHA105), se utilizó ThepGreen0229/MOMP quimérica, que amablemente ofreció E.E. Hood (Department of Biology, Utah State University), a través de electroporación.

55 Se seleccionaron clones positivos en medio LB complementado con kanamicina (50 µg/ml) y tetraciclina (5 µg/ml).

60 El ecotipo Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis thaliana* (The European Arabidopsis Stock Center, Loughborough, RU) se utilizó como base para la transformación de plantas. Después de sembrar en un suelo fertilizado una mezcla de Perlita: Vermiculita (1: 1: 1), las semillas se mantuvieron durante 5 días a 4°C (en la oscuridad) y después se transfirieron a una cámara de crecimiento (22°C, 16 h de luz, 8 h de oscuridad, humedad al 70 %). La tasa de fluorescencia de luz blanca fue de 100 µmol de fotones m⁻² s⁻¹ (RFA, radiación fotosintéticamente activa). Las plantas transgénicas se produjeron mediante el método simplificado de inmersión floral de plantas de *Arabidopsis* de cuatro semanas de vida, conocidas en la técnica y seleccionadas por germinación en medio de Murashige y Skog (MS) que contiene glufosinato de amonio (BASTA) (10 µg/ml) (Riedelde Haën, Seelze, Alemania) y sefatoxima (400 µg/ml) (Sigma, Steinheim, Alemania). Las plantas resistentes se transfirieron a una mezcla para macetas para análisis, autopolinización y producción de semillas. Las semillas obtenidas de plantas individuales que producen una

descendencia 100 % resistente a BASTA se usaron para experimentos adicionales.

Transformación de plantas en *Daucus carota*

5 En una realización alternativa, para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (cepa EHA105), se utilizó ThepGreen0229/MOMP quimérica, que amablemente ofreció E.E. Hood (Department of Biology, Utah State University), a través de electroporación.

Se seleccionaron clones positivos en medio LB complementado con kanamicina (50 µg/ml) y tetraciclina (5 µg/ml).

10 Semillas de *Daucus carota* (zanahoria) (L.) ssp. sativus cv Napoli F1 (Weibulls trädgård AB, Hammenhog, Suecia) se esterilizaron en cloro al 25 % [v/v] durante 45 min y durante 2 h más en cloro al 2,5 % [v/v], etanol al 70 % durante 1 min, y, finalmente, se lavaron tres veces en agua durante 1 h. Las semillas estériles de *D. carota* germinaron en medio MS sin reguladores del crecimiento y las células callosas se iniciaron a partir de hipocótilos extirpados mediante cultivo
 15 en medio MS con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1 mg/l). Las células callosas se suspendieron en medio líquido del mismo tipo y se hicieron crecer en la oscuridad en un agitador (90 rpm) a 25°C. Para la producción de embriones somáticos, las células se transfirieron a un medio MS sin regulador de crecimiento. Para la transformación, se tomaron células de zanahoria 10-14 días después de la adición de medio de crecimiento reciente. Las células de zanahoria se concentraron mediante centrifugación (a 100 g durante 1 min), se diluyeron 4-5 ml de células concentradas en medio líquido MS hasta 20 ml y se añadieron 600 µl de *A. tumefaciens* que llevaba el vector en medio LB (densidad óptica de 1,5 a 600 nm). Las células y las bacterias se cultivaron conjuntamente durante 3 días en la oscuridad a 25°C usando un agitador (90 rpm). Para la selección de células de zanahoria transgénicas, se lavaron reiteradamente tres veces por centrifugación en medio líquido MS para eliminar bacterias y posteriormente se incluyeron y se cultivaron en medio sin regulador de crecimiento complementado con BASTA (0, 1, 5 o 10 µg/ml) y cefotaxima (500 µg/ml) con luz tenue (1 µE/m²/s) a 25°C. La densidad de las células de zanahoria fue de 0,1-0,9 ml de células concentradas/10 ml de medio. Agregados en crecimiento, y en algunos casos plantas, se transfirieron a medio MS sin regulador de crecimiento sin BASTA. Las plantas se cultivaron *in vitro* y se aclimataron en 11 recipientes de plástico (PhytoTechnology Laboratories, Terrace Lenexa, KS, Estados Unidos) en un invernadero con vapor durante aproximadamente 2 semanas dando 18 h/6 h de luz/oscuridad con luz tenue y, posteriormente, se cultivaron en macetas utilizando el mismo período de luz pero con una intensidad lumínica de 50 µE/m²/s.

Inmunotransferencia

35 Para preparar muestras de proteínas, tejidos de *Arabidopsis* se molieron con un mortero y maja, en un tampón de extracción que contenía Tris 50 mM, urea 8 M, Triton X-100 al 1 % y DTT 1 mM (pH 7,5). Los extractos de proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). La membrana se bloqueó en BSA al 3 % (Sigma, Steinheim, Alemania) en TBS (Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4) durante 1 h y se exploró con anticuerpos monoclonales de ratón contra la MOMP de *Chlamydia trachomatis* (Acris Antibodies GmbH, Alemania) diluida a 1: 2 500 durante 1 h. La MOMP quimérica se detectó con anticuerpo anti ratón conjugado con fosfatasa alcalina (AP, siglas del inglés *alkaline phosphatase*) (Promega, Madison, WI) y se visualizó con NBT y BCIP (Promega, Madison, WI).

Extracción de ADN genómico y análisis de transferencia Southern

45 El ADN genómico de la planta se aisló usando el kit de purificación de ADN genómico JETFLEX (GENOMED GmbH, Löhne, Alemania), y 15 µg de ADN se escindieron con las enzimas *DraI*, *NdeI* o *NotI* (Sigma). Estas enzimas no escinden la secuencia de la MOMP quimérica. El ADN escindido se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y se transfirió a una membrana Hybond-N (GE Healthcare). La membrana se exploró con ADN de la MOMP quimérica marcado con ³²P-dCTP utilizando el sistema de etiquetado de ADN con cebadores aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA). El número de bandas observadas en la película de rayos X correspondió al número de inserciones de ADN-T en el genoma de la planta.

Verificación del inmunógeno construido

55 Se realizó un experimento piloto. Se inmunizaron cinco ratones (C57/bl6) con la quimera de MOMP recombinante por administración intranasal (i.n.) con 10 días de diferencia entre cada primovacunación. La dosis administrada fue de 10 µg de la quimera de MOMP recombinante purificada. Antes de iniciar la inmunización, y después de cada primovacunación, se extrajo sangre de los ratones y se analizó mediante un ensayo ELISA para determinar en suero la IgG anti quimera de MOMP. Placas ELISA (Nunc Maxisorp, Odense, Dinamarca) se recubrieron con la proteína MOMP quimérica recombinante (2 µg/ml). Los sueros se diluyeron en PBS. Los anticuerpos (Abs) anti quimera se detectaron con Abs de conejo anti Ig de ratón marcados con HRP y se visualizaron usando sustrato de O-fenilendiamina/H₂O₂ al 0,04 % en tampón citrato (pH4,5). Las reacciones se leyeron mediante espectrofotometría a 450 nm. La valoración log₁₀ de los títulos en suero de anti quimera de MOMP, mostró resultados prometedores (datos no mostrados).

65

Construcción de la MOMP quimérica y su sobreexpresión en *E. coli*

Los cebadores inverso y directo utilizados en la PCR para amplificar las regiones variables de VS2 y VS4 de MOMP para ensamblar la quimera, se diseñaron a partir de los datos de las secuencias de nucleótidos. La secuencia según la SEQ ID NO: 19, que codifica un enlazador flexible común, (Gly₄Ser₃)₃, según la SEQ ID NO: 20, se introdujo en el extremo 5' de los cebadores según las SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente. En una realización, la secuencia según la SEQ ID NO: 25, que codifica otro enlazador flexible común, (Gly₄Ser)₂Gly₄, según la SEQ ID NO: 26, se introdujo en el extremo 5' de los cebadores según las SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente. Los fragmentos de tipo VS2 y VS4 amplificados (SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente) se ensamblaron en la siguiente dirección 5'- SEQ ID NO: 1 : enlazador: SEQ ID NO: 2-3'. La quimera producida mostró el tamaño esperado de 351 pb, como lo muestra la banda fuerte en el carril L en la figura 2. La figura 2 muestra el resultado del análisis por PCR de la construcción génica ensamblada. N indica un control negativo de la reacción de PCR, L indica un marcador de tamaño de ADN. El producto se verificó mediante secuenciación y se clonó en el vector pET101. Como se observa en la figura 3, que muestra los resultados de un análisis de transferencia Western de la proteína MOMP quimérica recombinante expresada en *E. coli* y purificada usando tecnología de cromatografía de afinidad en una columna de Ni-NTA (níquel-ácido nitriloacético), la proteína sobreexpresada se detectó con Abs anti His (datos no mostrados) y con Abs anti MOMP (Acris Antibodies GmbH, Alemania). Se detectó una banda del tamaño esperado (17 kD) con anticuerpos monoclonales de ratón contra la MOMP de *Chlamydia trachomatis* (Acris Antibodies GmbH, Alemania). L indica un marcador de tamaño de proteína. Para la purificación, se aumentó la expresión de la quimera de MOMP en un cultivo bacteriano de 2 000 ml, utilizando tecnología de cromatografía de afinidad en una columna de Ni-NTA. La proteína quimérica purificada teñida con azul de Coomassie se muestra en la figura 4. La proteína purificada en condiciones naturales se usó después en experimentos de inmunización para verificar las características inmunogénicas de la construcción diseñada y para producir antisuero policlonal anti quimera de MOMP. La proteína purificada en condiciones desnaturalizadas se usó para el recubrimiento de placas ELISA para la detección de Abs específicos en suero de ratón.

Análisis de inserción transgénica y producción de quimera en la planta

La quimera de MOMP diseñada se ligó en el sitio de clonación SacI del vector pGreen, y se verificó la secuencia del fragmento clonado. El vector de expresión recombinante se usó para transformar plantas de *A. thaliana* del ecotipo Col-0. Después de la selección inicial de plántulas con bialfos, se seleccionaron cuarenta plantas transgénicas. En un análisis adicional, se usaron tres líneas transgénicas seleccionadas número 9, 15 y 25 y se demostró una integración estable del transgén durante hasta la sexta generación, como se observa en la figura 4.

En la figura 5 se muestra la detección por transferencia Western de la proteína MOMP quimérica expresada de manera constitutiva en extracto de hoja no fraccionada: una comparación de las tres líneas transgénicas, por duplicado "a" y "b", con plantas no transformadas (TS, como control negativo), revela una banda específica de tamaño apropiado que se ajusta bien al tamaño calculado de la quimera y de la proteína recombinante expresada en *E. coli*.

Las plantas transgénicas elegidas se sometieron a análisis de transferencia Southern para calcular el número de transgenes. Para la escisión de ADN genómico vegetal se utilizaron las enzimas de restricción *DraI*, *NdeI* y *MluI*. En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos con *DraI* y *NdeI*. Se produjeron diferentes cantidades de inserciones de transgenes en diferentes líneas: la línea 9 contenía un inserto, la línea 12 - tres, la línea 15 - dos y línea 25 - cuatro insertos. Aunque en las diferentes líneas había diferentes cantidades de transgenes, esto no influyó visualmente en el fenotipo de las plantas. Los transformantes tenían un aspecto morfológico idéntico en comparación con las plantas de tipo silvestre (TS) de *A. thaliana*.

Los resultados de la realización alternativa, utilizando *Daucus carota*, se analizaron moliendo con un mortero y maja, aproximadamente 200 mg de raíz de zanahoria en nitrógeno líquido. El polvo congelado se descongeló en hielo y se sometió a agitación vortical con 200 µl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,3) y después se analizó como se ha descrito anteriormente. En la figura 7 se muestran los resultados de una semicuantificación de las cantidades de la quimera de MOMP producidas, usando *Daucus carota* según lo anterior, con la cultivariedad (variedad cultivada) Karotan (línea +; indicada como Kar en la figura 7) y la cultivariedad Napoli (línea 313/3; indicada como 313/3 en la figura 7), y en comparación con cantidades estándar de nuestra proteína quimérica MOMP (180, 300, 600 y 1 200 ng). La línea Kar + produce 450 ng de MOMP por 40 µg de proteína soluble total (PST), que corresponde al 1 %. La línea Napoli 313/1 produce 600 ng MOMP por 20 µg de PST, que corresponde al 3 %.

Respuesta inmunitaria inducida en ratones con la proteína MOMP quimérica recombinante con etiquetas de His/V5

Cuatro grupos de diez ratones recibieron la quimera de MOMP construida según la SEQ ID NO: 6. La administración se realizó según lo siguiente:

Un primer grupo recibió tres veces, a intervalos de diez días, por vía intranasal (i.n.), 20 µl de una mezcla de 10 µg de la quimera de MOMP purificada y 1 µg de adyuvante de toxina del cólera (TC). Diez días después de la última administración de la quimera de MOMP + TC, los ratones recibieron una inyección subcutánea (s.c.) de Depo-Provera (Pfizer). Siete días después de la inyección de Depo-Provera, recibieron, por vía intravaginal, (i.vag), una administración de seguimiento (refuerzo) de 40 µl de una mezcla de 10 µg de quimera de MOMP + 1 µg de adyuvante de TC.

Un segundo grupo recibió tres veces, a intervalos de diez días, por vía oral, *Arabidopsis thaliana* transgénica, transformada según lo anterior. Cada vez, además de la alimentación regular, los ratones recibieron un exceso de *Arabidopsis thaliana* reciente. Diez días después de la última administración de *Arabidopsis thaliana* transgénica, los ratones recibieron una inyección subcutánea (s.c.) de Depo-Provera (Pfizer). Siete días después de la inyección de Depo-Provera (Pfizer), recibieron, por vía intravaginal, (i.vag), una administración de seguimiento (refuerzo) de 40 µl de una mezcla de 10 µg de quimera de MOMP + 1 µg de adyuvante de TC.

Un tercer grupo recibió tres veces, a intervalos de diez días, por vía oral, *Arabidopsis thaliana* transgénica, transformada según lo anterior. Cada vez, además de la alimentación regular, los ratones recibieron un exceso de *Arabidopsis thaliana* reciente. Diez días después de la última administración de *Arabidopsis thaliana* transgénica, los ratones recibieron una inyección subcutánea (s.c.) de Depo-Provera (Pfizer). Siete días después de la inyección de Depo-Provera (Pfizer), recibieron, por vía intravaginal (i.vag), 40 µl de una administración de seguimiento (refuerzo) de tampón PBS.

Como control negativo, se utilizó un cuarto grupo, es decir, sin ninguna administración.

La respuesta inmunitaria de los ratones se analizó mediante ensayo ELISA para detectar anticuerpos específicos de antígeno (IgG e IgA). A continuación, la fuerza de la respuesta inmunitaria se examinó exponiendo a los ratones a *Chlamydia trachomatis* para observar si se obtenía inmunidad protectora o respuesta inmunoprotectora. Diez días después del último tratamiento, se tomaron muestras sanguíneas y vaginales. Los ratones se trataron de nuevo con Depo-Provera (Pfizer) durante siete días y después se expusieron. Se tomaron muestras sanguíneas y de líquido vaginal y se analizaron mediante ensayo ELISA, como se ha descrito anteriormente en "Verificación del inmunógeno construido". Al analizar la respuesta inmunitaria en la secreción sérica y vaginal, la respuesta inmunitaria fue más fuerte en el primer grupo de ratones. El segundo y tercer grupo mostraron una respuesta más baja (algunos ratones fueron negativos). En la secreción vaginal, se detectaron niveles bajos de anticuerpos, principalmente de ratones del primer grupo.

Los resultados se resumen en las figuras 8 y 9. La figura 8 es un gráfico que muestra la respuesta inmunitaria (\log_{10} título de IgG) de los ratones de los grupos uno (●), dos (□) y tres (▲), respectivamente, mencionados anteriormente. Los resultados se dividen para exponer (de izquierda a derecha) la respuesta inmunitaria después de 1 administración, después de 2 administraciones, después de 3 administraciones, después de 3 administraciones más refuerzo, estímulo con el toxoide tetánico antigénico independiente (para asegurarse de que los ratones no sean hiperreactivos) y estímulo solo con el epítipo de V5. El grupo cuatro (control) mencionado anteriormente, no mostró ninguna respuesta (datos no mostrados).

Las figuras 9A y 9B son gráficos que muestran la respuesta inmunitaria (A - \log_{10} título de IgG; B - \log_{10} título de IgA) de los ratones de los grupos uno (●), dos (□) y tres (▲), respectivamente, mencionados anteriormente. Los resultados se dividen para exponer (de izquierda a derecha) la respuesta inmunitaria, medida mediante ensayo ELISA, dirigida a la quimera de MOMP y al epítipo de V5, respectivamente, después de 3 administraciones más refuerzo. Asimismo, el efecto protector causado por la inmunización con la quimera de MOMP construida, se estudió en ratones infectados con la serovariedad D de *Chlamydia trachomatis*. Los resultados, mostrados en la figura 10, se midieron según métodos estandarizados, es decir, el número de ratones portadores de la bacteria 8 (d8), 16 (d16), 32 (d32) y 40 (d40) días después de la infección, respectivamente. La barra negra representa ratones no inmunizados (cuarto grupo), la barra blanca representa ratones tratados con la quimera de MOMP producida en *E. coli* según lo anterior, con administración intranasal y refuerzo intravaginal (primer grupo) y la barra gris representa ratones tratados con la quimera de MOMP producida en *Arabidopsis thaliana* según lo anterior, con administración oral y refuerzo intravaginal (segundo grupo).

Como puede observarse, la inmunización proporciona claramente un efecto protector. Los ratones del primer grupo estaban parcialmente protegidos, con una recuperación más rápida que los del grupo de control.

Respuesta inmunitaria inducida en ratones con la proteína MOMP quimérica recombinante sin etiquetas de His/V5

Tres grupos de diez ratones, controlados por edad, recibieron la quimera de MOMP construida según la SEQ ID NO: 3, es decir, sin etiquetas de His/V5. La administración se realizó según lo siguiente:

Un primer grupo recibió tres veces, a intervalos de diez días, por vía intranasal (i.n.), 20 µl de una mezcla de 10 µg de quimera de MOMP purificada + 1 µg de adyuvante de TC. Diez días después de la última administración de la quimera de MOMP + TC, los ratones recibieron una inyección subcutánea (s.c.) de Depo-Provera (Pfizer). Siete días después de la inyección de Depo-Provera (Pfizer), recibieron, por vía intravaginal, (i.vag), una administración de seguimiento (refuerzo) de 40 µl de una mezcla de 10 µg de quimera de MOMP + 1 µg de adyuvante de TC.

Un segundo grupo recibió tres veces, a intervalos de diez días, por vía intranasal (i.n.), 20 µl de tampón PBS. Diez días después de la última administración de tampón PBS, los ratones recibieron una inyección subcutánea (s.c.) de Depo-Provera (Pfizer). Siete días después de la inyección de Depo-Provera (Pfizer), recibieron, por vía intravaginal, (i.vag), una administración de seguimiento (refuerzo) de 40 µl de una mezcla de 10 µg de quimera de MOMP + 1 µg de adyuvante de TC.

Como control negativo, se utilizó un tercer grupo, es decir, sin ninguna administración.

La respuesta inmunitaria de los ratones se midió exponiendo a los ratones a *Chlamydia trachomatis*. Diez días después del último tratamiento, se tomaron muestras sanguíneas y vaginales. Los ratones se trataron de nuevo con Depo-Provera (Pfizer) durante siete días y después se expusieron. Se tomaron muestras sanguíneas y de líquido vaginal y se analizaron mediante ensayo ELISA, como se ha descrito anteriormente en "Verificación del inmunógeno construido". En la figura 11 se muestra un aumento progresivo de la respuesta inmunitaria en el suero de ratones del primer grupo (puntos negros) después de cada administración. Los ratones del tercer grupo, de control, se muestran como cuadrados blancos.

El efecto protector causado por la inmunización con la quimera de MOMP construida, se estudió en ratones infectados con la serovariedad D de *Chlamydia trachomatis*. Los resultados, mostrados en la figura 12, se midieron según métodos estandarizados, es decir, el número de ratones portadores de la bacteria 7 o 14 días después de la infección, respectivamente. La barra blanca representa ratones no inmunizados (tercer grupo), la barra gris representa ratones tratados con la quimera de MOMP producida en *E. coli* según lo anterior, con administración intranasal y refuerzo intravaginal (primer grupo) y la barra negra representa ratones tratados con la quimera de MOMP producida en *E. coli* según lo anterior, solo con refuerzo intravaginal (segundo grupo).

Como puede observarse, la inmunización proporciona claramente un efecto protector.

Estudio de fertilidad de ratones inducida con la proteína MOMP quimérica recombinante sin etiquetas de His/V5

En paralelo al estudio de inmunización mencionado anteriormente, se realizó un estudio de fertilidad. Hembras de ratón, previamente inmunizadas con la proteína MOMP quimérica recombinante según la SEQ ID NO: 3, es decir, sin etiquetas de His/V5 se estudiaron más a fondo en cuatro grupos de diez ratones en cada uno de los siguientes grupos:

Un primer grupo era de ratones no inmunizados y sanos.

Un segundo era de ratones no inmunizados, pero infectados con la serovariedad D de *Chlamydia trachomatis*.

Un tercer grupo era de ratones que recibieron tres veces, a intervalos de diez días, por vía intranasal (i.n.), 20 µl de una mezcla de 10 µg de quimera de MOMP purificada + 1 µg de adyuvante de TC. Diez días después de la última administración de la quimera de MOMP + TC, los ratones recibieron una inyección subcutánea (s.c.) de Depo-Provera (Pfizer). Siete días después de la inyección de Depo-Provera (Pfizer), recibieron, por vía intravaginal, (i.vag), una administración de seguimiento (refuerzo) de 40 µl de una mezcla de 10 µg de quimera de MOMP + 1 µg de adyuvante de TC. Después, los ratones se expusieron a *Chlamydia trachomatis*.

Un cuarto grupo era de ratones que recibieron una inyección subcutánea (s.c.) de Depo-Provera (Pfizer). Siete días después de la inyección de Depo-Provera (Pfizer), recibieron, por vía intravaginal, (i.vag), una administración de seguimiento (refuerzo) de 40 µl de una mezcla de 10 µg de quimera de MOMP + 1 µg de adyuvante de TC. Después, los ratones se expusieron a *Chlamydia trachomatis*.

Todos los ratones se aparearon y, posteriormente, se pesaron para identificar la gestación. Las ratonas gestantes se sacrificaron y se efectuó un recuento del número de embriones.

El propósito del estudio era investigar el impacto del antígeno de la MOMP construida, sobre la fertilidad en ratones. Se comparó el número de embriones en ratones inmunizados y no inmunizados expuestos a *Chlamydia trachomatis*.

El efecto se registra como el número de ratones que producen descendencia después de haber sido infectados con la serovariedad D de *Chlamydia trachomatis*, y después de eso, se aparean. Como puede observarse en la figura 13, todas las ratonas no infectadas y vacunadas quedaron preñadas, mientras que el 40 % de las infectadas eran estériles.

Por tanto, este estudio demostró que *Chlamydia trachomatis* conduce a infertilidad en el 40 % de las ratonas infectadas, mientras que el 100 % de las ratonas no infectadas y las que han sido infectadas después de la administración de la quimera de MOMP construida según la SEQ ID NO: 3, son fértiles. En una realización, se proporciona un método para inducir una respuesta inmunoprotectora contra *Chlamydia trachomatis* en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido según el primer aspecto o el compuesto según el segundo aspecto o la composición según el séptimo aspecto.

En una realización, dicho mamífero es un ser humano.

Aunque la presente invención descrita anteriormente se ha hecho con referencia a realizaciones específicas, no se pretende que esté limitada a la forma específica expuesta en el presente documento. Más bien, la invención está únicamente limitada por las reivindicaciones adjuntas y también son posibles otras realizaciones distintas a las anteriormente especificadas dentro del ámbito de estas reivindicaciones adjuntas.

En las reivindicaciones, los términos "comprende/comprendiendo" no excluyen la presencia de otros elementos o etapas. Asimismo, aunque se enumeren individualmente, puede aplicarse una pluralidad de medios, elementos o etapas del método, por ejemplo, como una sola unidad. Asimismo, aunque pueden incluirse características individuales en diferentes reivindicaciones, posiblemente estas pueden combinarse de manera ventajosa, y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea factible y/o ventajosa. Además,

las referencias singulares no excluyen una pluralidad. Los términos "un", "uno(a)", "primero(a)", "segundo(a)", etc. no excluye una pluralidad. Los signos de referencia en las reivindicaciones se proporcionan simplemente como un ejemplo aclaratorio y de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

5 Texto independiente de listado de secuencias

En el listado de secuencias, las siguientes secuencias artificiales tienen información de texto independiente:

SEQ ID NO: 4	etiqueta de V5
SEQ ID NO: 5	etiqueta de His
SEQ ID NO: 10	Cebador directo 1 de VS2
SEQ ID NO: 11	Cebador inverso 1 de VS2
SEQ ID NO: 12	Cebador directo 1 de VS4
SEQ ID NO: 13	Cebador inverso 1 de VS4
SEQ ID NO: 14	Cebador directo 2 y 3 de VS2
SEQ ID NO: 15	Cebador inverso 2 de VS2
SEQ ID NO: 16	Cebador directo 2 de VS4
SEQ ID NO: 17	Cebador inverso 2 y 3 de VS4
SEQ ID NO: 18	cebador inverso de VS4, TERMINACIÓN
SEQ ID NO: 19	Secuencia enlazadora
SEQ ID NO: 20	Secuencia enlazadora
SEQ ID NO: 25	Secuencia enlazadora
SEQ ID NO: 26	Secuencia enlazadora

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Spixia Biotechnology AB

<120> Antígeno de la MOMP quimérica, Método y Uso

<130> W102660001

<150> SE1050535-2

<151> 28/05/2010

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 1

Met G₁ly Asp Asn G₅lu Asn G₁ln Ser Thr Va₁₀l Lys Thr Asn Ser Va₁₅l Pro

Asn Met Ser Leu Asp G₁ln Ser Va₂₀l Va₂₅l G₁lu Leu

<210> 2

<211> 75

<212> PRT

<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 2

ES 2 788 728 T3

Trp Gln Ala Ser Leu Ala Leu Ser Tyr Arg Leu Asn Met Phe Thr Pro
1 5 10 15

Tyr Ile Gly Val Lys Trp Ser Arg Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile
20 25 30

Arg Ile Ala Gln Pro Lys Ser Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr
35 40 45

Leu Asn Pro Thr Ile Ala Gly Ala Gly Asp Val Lys Ala Ser Ala Glu
50 55 60

Gly Gln Leu Gly Asp Thr Met Gln Ile Val Ser
65 70 75

5 <210> 3
<211> 116
<212> PRT
<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 3

Met Gly Asp Asn Glu Asn Gln Ser Thr Val Lys Thr Asn Ser Val Pro
1 5 10 15

10 Asn Met Ser Leu Asp Gln Ser Val Val Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Trp Gln Ala Ser Leu Ala Leu
35 40 45

Ser Tyr Arg Leu Asn Met Phe Thr Pro Tyr Ile Gly Val Lys Trp Ser
50 55 60

Arg Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Arg Ile Ala Gln Pro Lys Ser
65 70 75 80

Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr Leu Asn Pro Thr Ile Ala Gly
85 90 95

Ala Gly Asp Val Lys Ala Ser Ala Glu Gly Gln Leu Gly Asp Thr Met
100 105 110

Gln Ile Val Ser
115

15 <210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> etiqueta de V5

<400> 4

ES 2 788 728 T3

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 1 5 10

5 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> etiqueta de His

<400> 5

His His His His His His
 1 5

15 <210> 6
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> *Chlamydia trachomatis*

20 <400> 6

Met Gly Asp Asn Glu Asn Gln Ser Thr Val Lys Thr Asn Ser Val Pro
 1 5 10 15

Asn Met Ser Leu Asp Gln Ser Val Val Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Trp Gln Ala Ser Leu Ala Leu
 35 40 45

Ser Tyr Arg Leu Asn Met Phe Thr Pro Tyr Ile Gly Val Lys Trp Ser
 50 55 60

Arg Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Arg Ile Ala Gln Pro Lys Ser
 65 70 75 80

Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr Leu Asn Pro Thr Ile Ala Gly
 85 90 95

Ala Gly Asp Val Lys Ala Ser Ala Glu Gly Gln Leu Gly Asp Thr Met
 100 105 110

Gln Ile Val Ser Lys Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro
 115 120 125

Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His
 130 135 140

His His His His
 145

25 <210> 7
 <211> 81

ES 2 788 728 T3

	<212> ADN		
	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>		
	<400> 7		
5	atgggagata atgaaaatca aagcacggtc aaaacgaatt ctgtaccaa tatgagctta		60
	gatcaatctg ttgttgaact t		81
	<210> 8		
	<211> 225		
10	<212> ADN		
	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>		
	<400> 8		
	tggcaagcaa gtttagctct ctcttacaga ttgaatatgt tcaactcccta cattggagtt		60
	aaatggctct gagcaagttt tgatgccgat acgattcgta tagcccagcc aaaatcagct		120
	acagctatct ttgatactac cacgcttaac ccaactattg ctggagctgg cgatgtgaaa		180
15	gctagcgcag agggtcagct cggagatacc atgcaaatcg tctcc		225
	<210> 9		
	<211> 348		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>		
	<400> 9		
	atgggagata atgaaaatca aagcacggtc aaaacgaatt ctgtaccaa tatgagctta		60
	gatcaatctg ttgttgaact tgggtggaggc ggttcaggcg gaggtggatc cggcgggtggc		120
	ggatggcaag caagtttagc tctctcttac agattgaata tgttcaactcc ctacattgga		180
	gttaaattggt ctcgagcaag ttttgatgcc gatacgattc gtatagcca gccaaaatca		240
	gctacagcta tctttgatac taccacgctt aaccaacta ttgctggagc tggcgatgtg		300
25	aaagctagcg cagaggggtca gctcggagat accatgcaaa tcgtctcc		348
	<210> 10		
	<211> 23		
30	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador directo 1 de VS2		
	<400> 10		
35	tattgggat cgcttgatg tat	23	
	<210> 11		
	<211> 23		
40	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador inverso 1 de VS2		
45	<400> 11		
	tattgaaag aagcccctaa agt	23	

ES 2 788 728 T3

5	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador directo 1 de VS4	
10	<400> 12 ctctgcact catagcagga act	23
15	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador inverso 1 de VS4	
20	<400> 13 tgtaactgcg tatttgctg cat	23
25	<210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador directo 2 y 3 de VS2	
30	<400> 14 cacatggga gataatgaaa a	21
35	<210> 15 <211> 57 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador inverso 2 de VS2	
40	<400> 15 ccgccggatc cacctccgcc tgaaccgcct ccaccaagtt caacaacaga ttgatct	57
45	<210> 16 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador directo 2 de VS4	
50	<400> 16 caggcggagg tggatccggc ggtggcggat ggcaagcaag ttagctctc tct	53
55	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador inverso 2 y 3 de VS4	
60	<400> 17 ggagacgatt tgcattggtat	20

ES 2 788 728 T3

<210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador inverso de VS4, TERMINACIÓN
 10
 <400> 18
 attgagctcg cctcaggaga c 21
 <210> 19
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia enlazadora
 20
 <400> 19
 ggtggaggcg gtcaggcgg aggtggatcc ggcggtggcg gatgg 45
 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia enlazadora
 30
 <400> 20
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 35
 <210> 21
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Chlamydia trachomatis*
 40
 <400> 21
 Gly Asp Asn Glu Asn Gln Ser Thr Val Lys Thr Asn Ser Val Pro Asn
 1 5 10 15
 Met Ser Leu Asp Gln Ser Val Val Glu Leu
 20 25
 45
 <210> 22
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Chlamydia trachomatis*
 50
 <400> 22

ES 2 788 728 T3

Ala Ser Leu Ala Leu Ala Tyr Arg Leu Asn Met Phe Thr Pro Tyr Ile
1 5 10 15

Gly Val Lys Trp Ser Arg Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Arg Ile
20 25 30

Ala Gln Pro Lys Ser Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr Leu Asn
35 40 45

Pro Thr Ile Ala Gly Ala Gly Asp Val Lys Ala Ser Ala Glu Gly Gln
50 55 60

Leu Gly Asp Thr Met Gln Ile Val Ser
65 70

5
<210> 23
<211> 26
<212> PRT
<213> *Chlamydia trachomatis*
<400> 23

Gly Asp Asn Glu Asn Gln Lys Thr Val Lys Ala Glu Ser Val Pro Asn
1 5 10 15

10
Met Ser Phe Asp Gln Ser Val Val Glu Leu
20 25

15
<210> 24
<211> 73
<212> PRT
<213> *Chlamydia trachomatis*
<400> 24

Ala Ser Leu Ala Leu Ala Tyr Arg Leu Asn Met Phe Thr Pro Tyr Ile
1 5 10 15

Gly Val Lys Trp Ser Arg Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Arg Ile
20 25 30

Ala Gln Pro Lys Ser Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr Leu Asn
35 40 45

Pro Thr Ile Ala Gly Ala Gly Asp Val Lys Thr Gly Ala Glu Gly Gln
50 55 60

Leu Gly Asp Thr Met Gln Ile Val Ser
65 70

20
<210> 25
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial
25
<220>
<223> Secuencia enlazadora

ES 2 788 728 T3

<400> 25
ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggatcc ggcggtggcg ga 42

5 <210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 26

15 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende una primera secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 y una segunda secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, en donde dichas primera y segunda secuencias de aminoácidos, están separadas por menos de 30 restos de aminoácidos, y en donde la primera secuencia de aminoácidos y la segunda secuencia de aminoácidos están separadas por un enlazador según la SEC ID NO: 20 o la SEC ID NO: 26.
- 10 2. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 3.
3. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, fusionado a una secuencia de aminoácidos que comprende una etiqueta de His según la SEQ ID NO: 5 o una etiqueta de V5 según la SEQ ID NO: 4.
- 15 4. El polipéptido según la reivindicación 3, que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6.
5. Un compuesto que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 7. El ácido nucleico según la reivindicación 6, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según la SEQ ID NO: 9.
8. Un plásmido que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7.
- 25 9. Una célula transformada con un vector de expresión, en donde el vector de expresión es un plásmido según la reivindicación 8, eligiéndose la célula del grupo que consiste en una célula vegetal, una bacteria, una célula de levadura, una célula fúngica, una célula de insecto o una célula de mamífero.
- 30 10. Un proceso para producir un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuyo proceso comprende cultivar una célula según la reivindicación 9 y recuperar el polipéptido.
11. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un compuesto según la reivindicación 5, para su uso como un medicamento.
- 35 12. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un compuesto según la reivindicación 5, para su uso como una vacuna contra *Chlamydia trachomatis*, o para su uso para impedir la infertilidad como resultado de una infección con *Chlamydia trachomatis*.
- 40 13. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un compuesto según la reivindicación 5, para su uso según la reivindicación 12, en donde el polipéptido se administra por vía nasal.

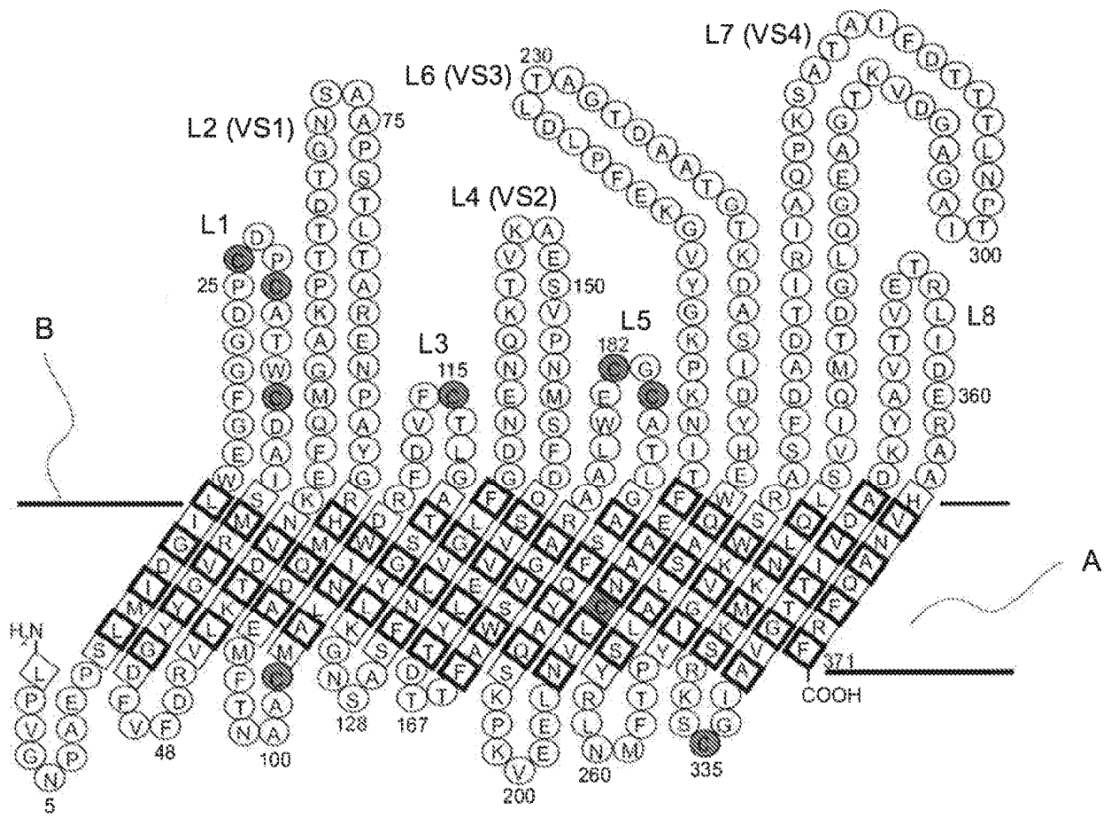


Fig. 1

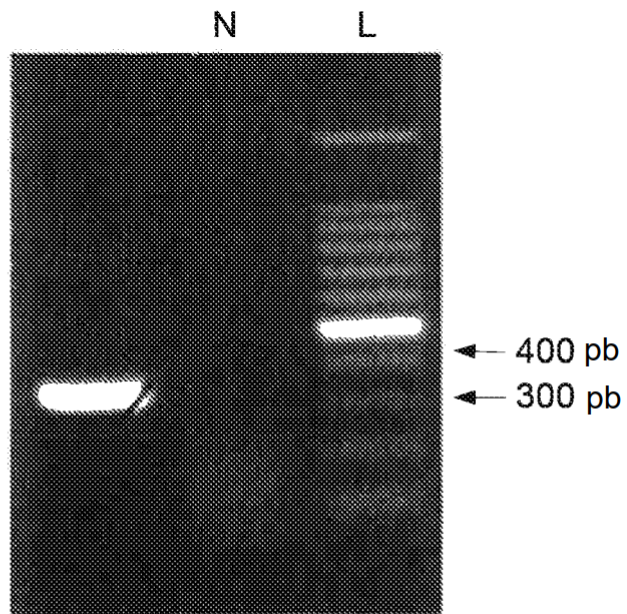


Fig. 2

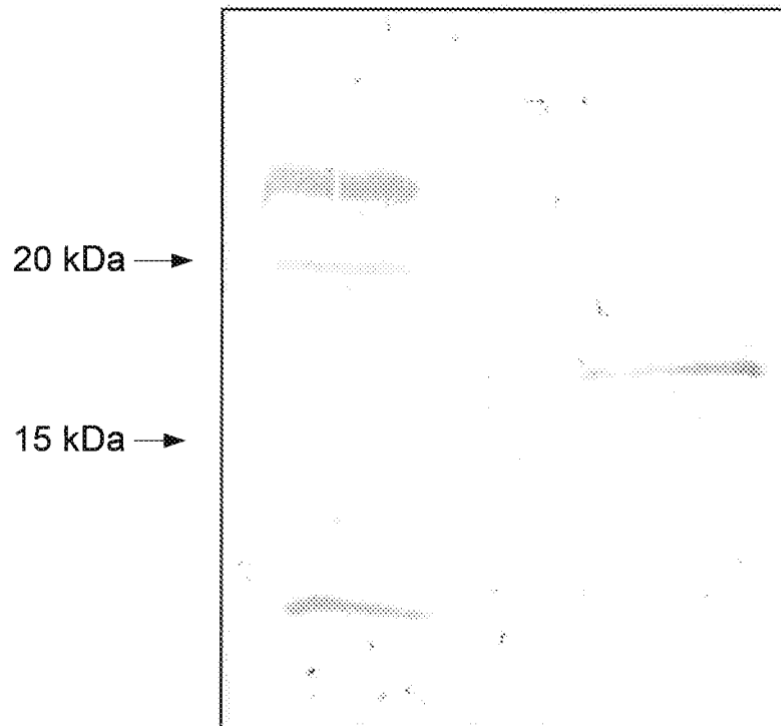


Fig. 3

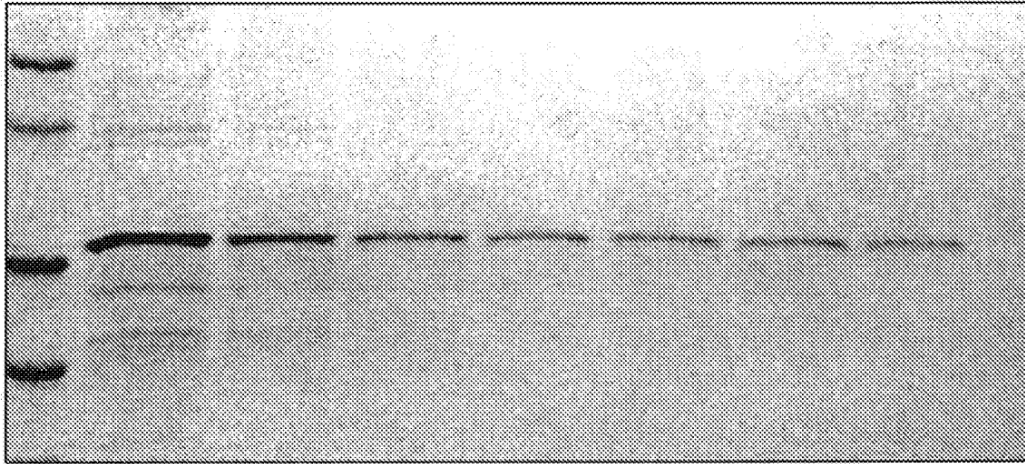


Fig. 4

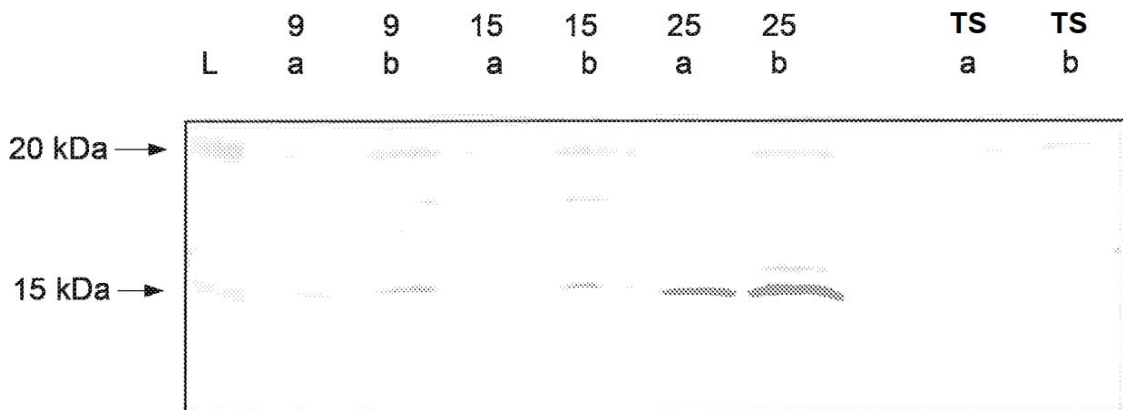


Fig. 5

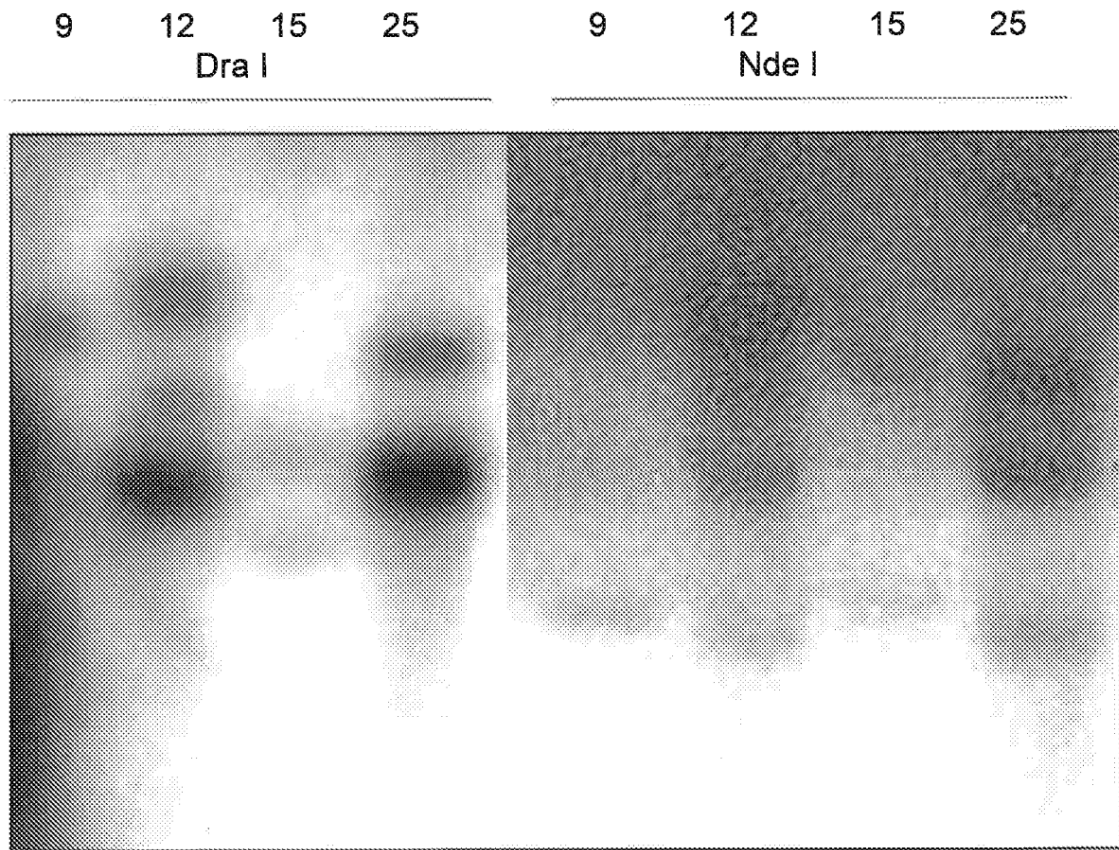


Fig. 6

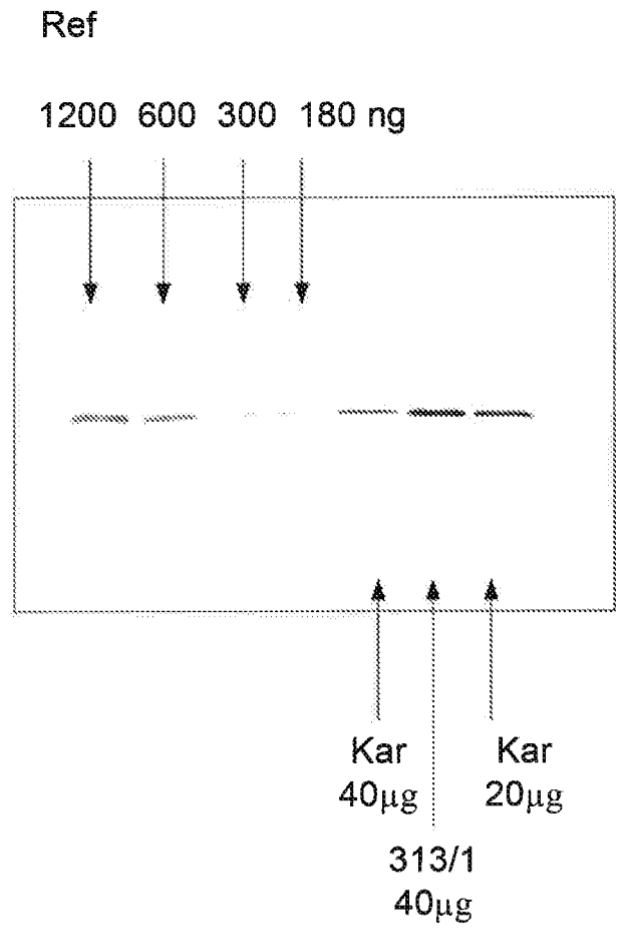


Fig. 7

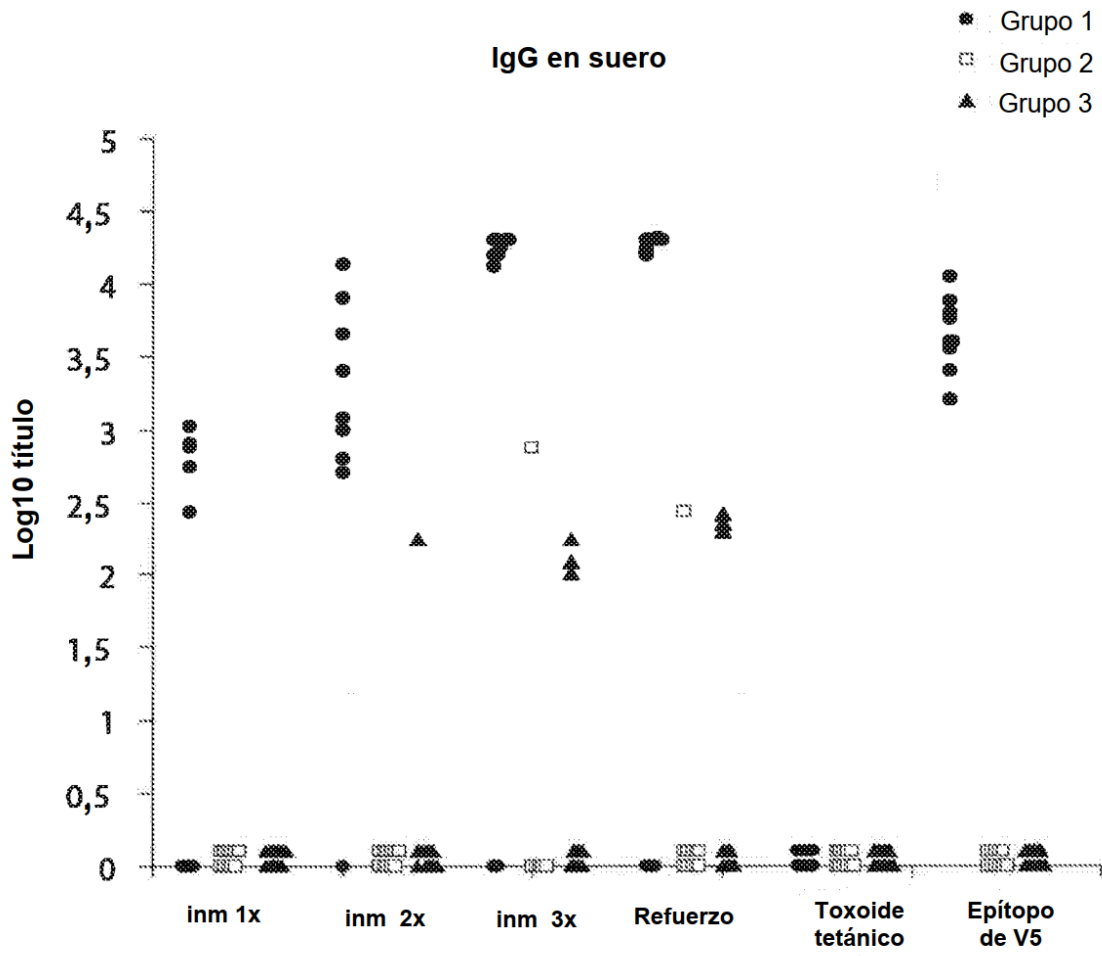


Fig. 8

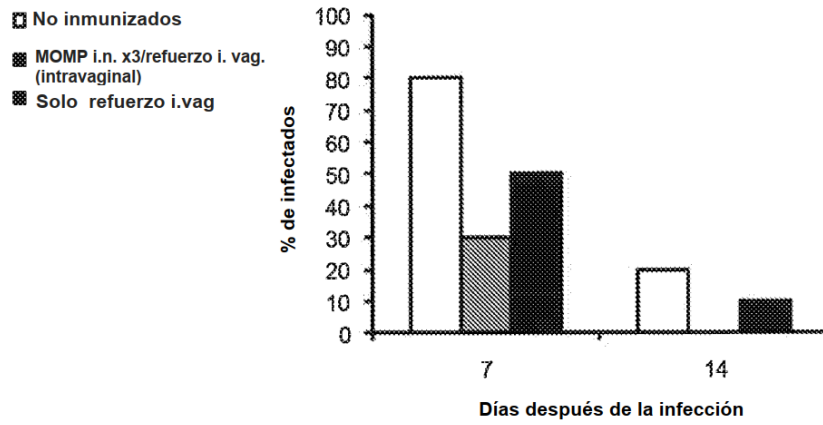


Fig. 12

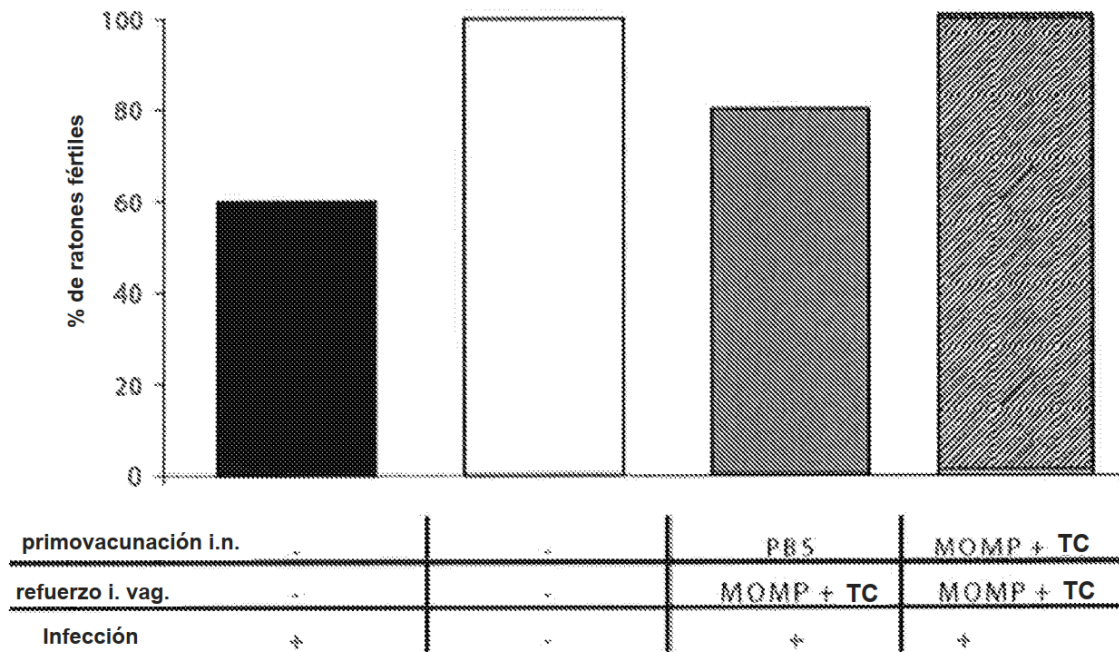


Fig. 13

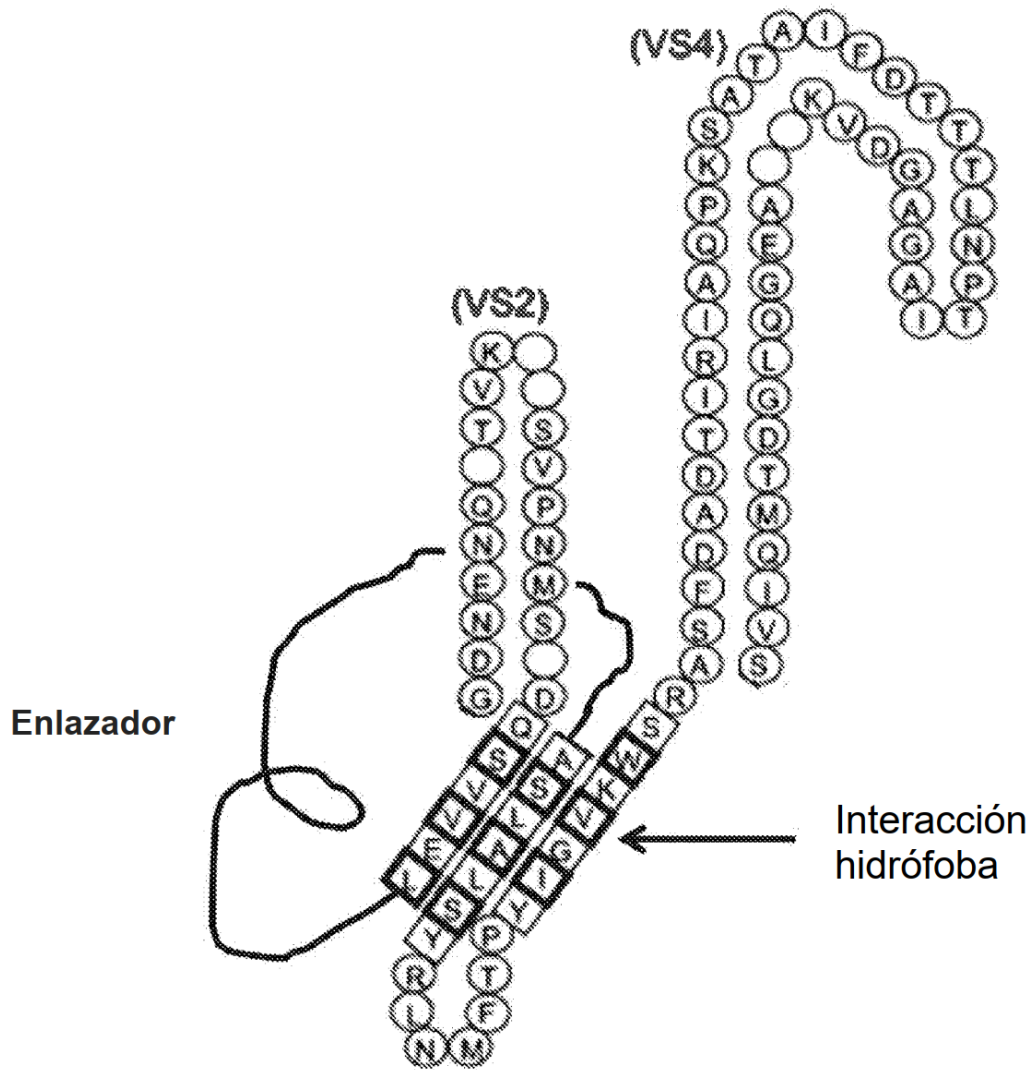


Fig. 14

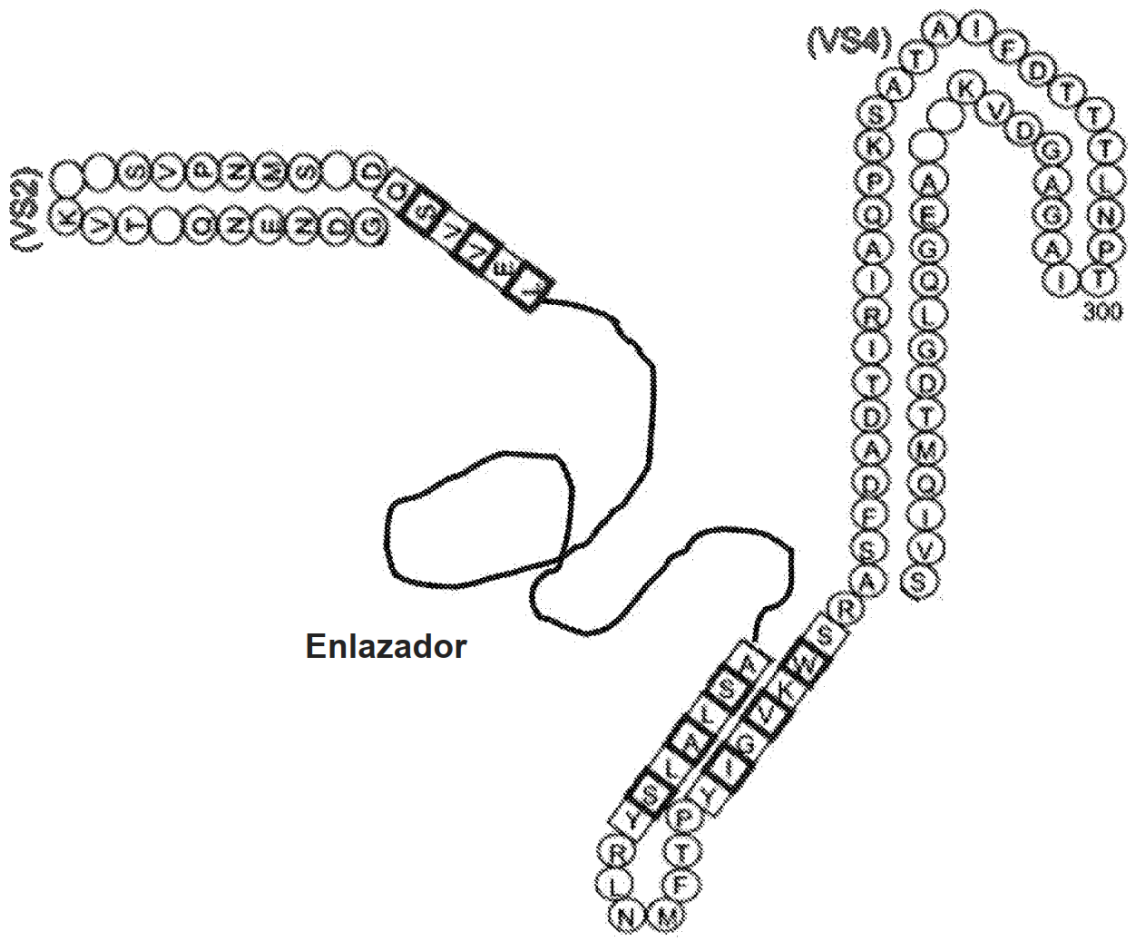


Fig. 15