

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 622**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/12** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2017** E 17382654 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** EP 3461841

54 Título: **Anticuerpos anti-Dps y dispositivos de prueba para la detección de bacterias del género Campylobacter**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.05.2020**

73 Titular/es:

**CERTEST BIOTEC, S.L. (100.0%)**  
**Polígono Industrial Río Gállego II, Calle J nº 1**  
**50840 San Mateo De Gallego (Zaragoza), ES**

72 Inventor/es:

**LANDETA ELORZ, OSCAR;**  
**GARCÍA MIGUEL, YOLANDA;**  
**MARTÍNEZ OLIVÁN, JUAN ENRIQUE y**  
**VELASCO MICHELENA, BEATRIZ**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

**ES 2 759 622 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

Anticuerpos anti-Dps y dispositivos de prueba para la detección de bacterias del género *Campylobacter*

5 **Campo técnico**

La presente invención puede incluirse en el campo de diagnóstico. Específicamente, la presente invención proporciona un anticuerpo que es específico para la proteína de unión de ADN de células privadas de nutrientes (Dps) de bacterias del género *Campylobacter* y un hibridoma que produce dicho anticuerpo. El anticuerpo puede usarse en un dispositivo de prueba inmunocromatográfico y en un método para detectar bacterias del género *Campylobacter*.

**Antecedentes de la técnica**

15 En humanos, del 85% al 95% de infecciones por la especie *Campylobacter* implican *Campylobacter jejuni*, mientras que *Campylobacter coli* está implicada en la mayoría de los otros casos. *C. jejuni* es una de las causas más comunes de intoxicación alimentaria en los Estados Unidos y en Europa. La gran mayoría de casos se producen como acontecimientos aislados, no como parte de brotes reconocidos. La vigilancia activa a través de la Red de Vigilancia Activa de Enfermedades (FoodNet) indica que cada año se diagnostican aproximadamente 14 casos por cada 20 100.000 personas en la población. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria estimó en 2011 que había aproximadamente nueve millones de casos de campilobacteriosis humana por año en la Unión Europea.

La intoxicación alimentaria causada por la especie *Campylobacter* puede ser gravemente debilitante, pero rara vez pone en peligro la vida. Se ha relacionado con el desarrollo posterior del síndrome de Guillain-Barré, que se desarrolla normalmente de dos a tres semanas después de la enfermedad inicial. Los individuos con infecciones recientes por *C. jejuni* desarrollan el síndrome de Guillain-Barré a una velocidad de 0,3 por 1000 infecciones, aproximadamente 100 veces más frecuente que la población general.

Por tanto, actualmente existe la necesidad de detectar especies del género *Campylobacter*. Los dispositivos previos para la detección de *Campylobacter jejuni* en muestras de heces han implicado el uso de dispositivos de prueba inmunocromatográficos que detectan una proteína de superficie de *Campylobacter jejuni* (documento JP5467228B2; documento JP 2009077658 (A); Granato *et al.*, 2010. Comparison of Premier CAMPY Enzyme Immunoassay (EIA), ProSpecT *Campylobacter* EIA, and Immuno Card STAT! CAMPY test with culture for laboratory diagnosis of *Campylobacter* enteric infections. *J. Clin. Microb.* 4022-4027). Sin embargo, los dispositivos de detección actuales pueden carecer de especificidad, lo que produce falsos positivos (Bessede *et al.*, 2011. New Methods for Detection of *Campylobacter* in Stool samples in comparison to culture. *J. Clin. Microb.* 941-944; Couturier *et al.*, 2003. Detection of non-*jejuni* and *Campylobacter* species from stool specimens with an immunochromatographic antigen detection assay. *J. Clin. Microbiol.* (6):1935-7). Además, estos dispositivos pueden carecer de sensibilidad.

40 Existe la necesidad de un dispositivo de prueba que produzca menos falsos positivos y que sea más sensible que los dispositivos de prueba actualmente disponibles. Mediante el uso de un anticuerpo que se une a la proteína de unión de ADN de células privadas de nutrientes (Dps) de *C. jejuni* y *C. coli*, los inventores de la presente solicitud han desarrollado un dispositivo de prueba que produce menos falsos positivos y es más sensible que otros dispositivos actualmente disponibles.

45 Hua Piao *et al.*, 2010 [Hua Piao *et al.*, 2010. Tissue Binding Patterns and *In Vitro* Effects of *Campylobacter jejuni* DNA-Binding Protein from Starved Cells. *Neurochemical Research* 36(1):58-66. DOI: 10.1007/s11064-010-0263-7] y el documento WO 2008/008092 divulgan anticuerpos monoclonales anti-proteína de unión de ADN de células privadas de nutrientes (Dps), pero no divulgan el anticuerpo reivindicado en la presente invención que se define con precisión por sus secuencias de aminoácidos VL y VH.

**Figuras**

Figura 1: diagrama del dispositivo de prueba inmunocromatográfico. A) Vista panorámica del dispositivo de prueba inmunocromatográfico en forma de una tira. El dispositivo de prueba comprende los siguientes elementos: un material (1) absorbente, una membrana (2) de soporte con una sección (3) de detección y una sección (4) de control, una sección (5) de adición de muestra y una sección (6) del dispositivo que comprende el anticuerpo marcado. La flecha indica la dirección del flujo. B) Vista lateral del dispositivo de prueba inmunocromatográfico en forma de una tira. El dispositivo de prueba comprende además un soporte (7) de plástico. (c) Vista lateral en ángulo del dispositivo de prueba inmunocromatográfico.

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a Dps, un hibridoma que produce el anticuerpo de la presente invención y un dispositivo de prueba inmunocromatográfico que comprende: (a) un primer anticuerpo que se une específicamente a Dps, (b) un segundo anticuerpo que se une específicamente a Dps, y (c)

una membrana de soporte, en el que el primer anticuerpo está inmovilizado en la membrana de soporte y el segundo anticuerpo está marcado. Además, la presente invención proporciona un método para detectar bacterias del género *Campylobacter* en una muestra aislada que comprende poner en contacto la muestra con el dispositivo de prueba de la presente invención, el uso del anticuerpo de la presente invención para la detección de bacterias del género *Campylobacter* y el uso del anticuerpo de la presente invención para la fabricación de un dispositivo de prueba de inmunoensayo.

### Descripción detallada de la invención

#### Anticuerpo

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a Dps.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende al menos una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. El término anticuerpo incluye, por ejemplo, anticuerpos maduros de cadena completa y fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede incluir una secuencia de dominio variable de cadena pesada (H) (abreviada en el presente documento como VH), y una secuencia de dominio variable de cadena ligera (L) (abreviada en el presente documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos secuencias de dominio variable de cadena pesada (H) y dos secuencias de dominio variable de cadena ligera (L), formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno, tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc, Fd, Fd', Fv, anticuerpos de cadena sencilla (scFv, por ejemplo), anticuerpos de dominio variable único, diacuerpos (Dab) (bivalentes y biespecíficos) y anticuerpos quiméricos (por ejemplo, humanizados), que pueden producirse mediante la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados *de novo* usando tecnologías de ADN recombinante. Estos fragmentos de anticuerpo funcionales retienen la capacidad para unirse selectivamente con su respectivo antígeno o receptor. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pueden ser de cualquier clase de anticuerpos, incluyendo, pero no limitados a, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, y de cualquier subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) de anticuerpos. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser monoclonales o policlonales. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humano, humanizado, injertado con CDR o generado *in vitro*. El anticuerpo puede tener una región constante de cadena pesada elegida de, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El anticuerpo también puede tener una cadena ligera elegida de, por ejemplo, kappa o lambda. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de diacuerpo (dAb), que consiste en un dominio VH; (vi) un dominio variable camélido o camelizado; (vii) un Fv de cadena sencilla (scFv), véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; (viii) un anticuerpo de dominio único. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "anticuerpo" incluye moléculas intactas. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden alterarse, por ejemplo, mutarse, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir uno o más de: unión al receptor de Fc, glicosilación del anticuerpo, el número de residuos de cisteína, la función de la célula efectora o función del complemento).

Las moléculas de anticuerpo también pueden ser anticuerpos de dominio único. Los anticuerpos de dominio único pueden incluir anticuerpos cuyas regiones determinantes de complementariedad forman parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos convencionales de 4 cadenas, anticuerpos modificados por ingeniería genética y andamiajes de dominio único distintos a los derivados de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio único pueden ser cualquiera de la técnica, o cualquier anticuerpo de dominio único futuro. Los anticuerpos de dominio único pueden derivarse de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitarse a, ratón, humano, camello, llama, pez, tiburón, cabra, conejo y bovino. Según otro aspecto de la divulgación, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único que se produce de manera natural conocido como anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras. Tales anticuerpos de dominio único se divulgan en el documento WO 9404678, por ejemplo. Por motivos de claridad, este dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada naturalmente desprovisto de cadena ligera se conoce en el presente documento como VHH o nanocuerpo para distinguirlo de la VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Una molécula de VHH de este tipo puede derivarse de anticuerpos generados en la especie *Camelidae*, por ejemplo en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de *Camelidae* pueden producir anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadena ligera.

Las regiones VH y VL pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones de entramado" (FR o FW).

La extensión de la región de entramado y las CDR se ha definido con precisión por varios métodos (véanse, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, publicación NIH n.º 91-3242; Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; y la definición de AbM usada por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véase, en general, por ejemplo, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg).

Los términos “región determinante de complementariedad” y “CDR”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de anticuerpos que confieren especificidad de antígeno y afinidad de unión. En general, existen tres CDR en cada región variable de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres CDR en cada región variable de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse usando cualquier de los esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat *et al.* (1991), “*Sequences of Proteins of Immunological Interest*”, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración de “Kabat”), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273, 927-948 (esquema de numeración de “Chothia”). Tal como se usa en el presente documento, las CDR definidas según el esquema de números de “Chothia” también se denomina a veces “bucles hipervariables”.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad de unión única y afinidad para un epítipo particular. Un anticuerpo monoclonal puede elaborarse mediante tecnología de hibridoma o mediante métodos que no usan tecnología de hibridoma (por ejemplo, métodos recombinantes). El anticuerpo del mismo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo puede producirse de manera recombinante, por ejemplo, producirse mediante visualización de fagos o mediante métodos combinatorios. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

La visualización de fagos y los métodos combinatorios para generar anticuerpos se conocen en la técnica (tal como se describe en, por ejemplo, Ladner *et al.* patente estadounidense n.º 5.223.409; Kang *et al.* publicación internacional n.º WO 92/18619; Dower *et al.* publicación internacional n.º WO 91/17271; Winter *et al.* publicación internacional WO 92/20791; Markland *et al.* publicación internacional n.º WO 92/15679; Breitling *et al.* publicación internacional WO 93/01288; McCafferty *et al.* publicación internacional n.º WO 92/01047; Garrard *et al.* publicación internacional n.º WO 92/09690; Ladner *et al.* publicación internacional n.º WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano (por ejemplo, un anticuerpo elaborado en un ratón que se ha modificado genéticamente por ingeniería para producir un anticuerpo a partir de una secuencia de inmunoglobulina humana), o un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, mono), camello. Preferiblemente, el anticuerpo no humano es un roedor (anticuerpo de ratón o rata). Los métodos de producción de anticuerpos de roedor se conocen en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse usando ratones transgénicos que portan los genes de inmunoglobulina humana en lugar del sistema de ratón. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés se usan para producir hibridomas que secretan Acm humanos con afinidades específicas para epítopos a partir de una proteína humana (véanse, por ejemplo, Wood *et al.* solicitud internacional WO 91/00906, Kucherlapati *et al.* publicación PCT WO 91/10741; Lonberg *et al.* solicitud internacional WO 92/03918; Kay *et al.* solicitud internacional 92/03917; Lonberg, N. *et al.* 1994 *Nature* 368:856-859; Green, L.L. *et al.* 1994 *Nature Genet.* 7:13-21; Morrison, S.L. *et al.* 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Bruggeman *et al.* 1993 *Year Immunol* 7:33-40; Tuaille *et al.* 1993 *PNAS* 90:3720-3724; Bruggeman *et al.* 1991 *Eur J Immunol* 21:1323-1326).

Un anticuerpo puede ser uno en el que la región variable, o una parte de la misma, por ejemplo, las CDR, se generan en un organismo no humano, por ejemplo, una rata o un ratón. Los anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados están dentro la invención. Los anticuerpos generados en un organismo no humano, por ejemplo, una rata o un ratón, y luego modificados, por ejemplo, en la región constante o de entramado variable o, para disminuir la antigenicidad en un humano están dentro la invención.

Los anticuerpos quiméricos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica (véanse Robinson *et al.*, publicación de patente internacional PCT/US86/02269; Akira, *et al.*, solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, M., solicitud de patente europea 171.496; Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 173.494; Neuberger *et al.*, solicitud internacional WO 86/01533; Cabilly *et al.* patente estadounidense n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, solicitud de patente europea 125.023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *PNAS* 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *PNAS* 84:214-218; Nishimura *et*

*al.*, 1987, Canc. Res.47:999-1005; Wood *et al.* (1985) Nature 314:446-449; y Shaw *et al.*, 1988, J. Natl Cancer Inst.80:1553-1559).

5 Un anticuerpo humanizado o injertado con CDR tendrá al menos una o dos, pero generalmente las tres, CDR receptoras (de cadenas de inmunoglobulina pesada y/o ligera) reemplazadas con una CDR donante. El anticuerpo puede reemplazarse con al menos una parte de una CDR no humana o sólo algunas de las CDR pueden reemplazarse con CDR no humanas. Sólo es necesario reemplazar el número de CDR requeridas para la unión del anticuerpo humanizado a Dsp. Preferiblemente, el donante será un anticuerpo de roedor, por ejemplo, un anticuerpo de rata o ratón, y el receptor será una región de entramado humana o una región de entramado consenso humana. Normalmente, la inmunoglobulina que proporciona las CDR se denomina el "donante" y la inmunoglobulina que proporciona la región de entramado se denomina el "ceptor". En una realización, la inmunoglobulina donante es una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, roedor). La región de entramado aceptora es una región de entramado que se produce de manera natural (por ejemplo, una humana) o una región de entramado consenso, o una secuencia aproximadamente el 85% o superior, preferiblemente el 90%, el 95%, el 99% o superior idéntica a la misma.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que se producen con mayor frecuencia en una familia de secuencias relacionadas (véase por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987)). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se produce con mayor frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se producen con una misma frecuencia, cualquiera puede incluirse en la secuencia consenso. Un "entramado consenso" se refiere a la región de entramado en la secuencia consenso de la inmunoglobulina.

25 Un anticuerpo puede humanizarse mediante métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Morrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207, por Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214, y por Queen *et al.* Documentos US 5.585.089, US 5.693.761 y US 5.693.762.

30 Los anticuerpos humanizados o injertados con CDR pueden producirse mediante injerto de CDR o sustitución de CDR, en los que se reemplazan una, dos o todas las CDR de una cadena de inmunoglobulina. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 5.225.539; Jones *et al.* 1986 Nature 321:552-525; Verhoeyan *et al.* 1988 Science 239:1534; Beidler *et al.* 1988 J. Immunol.141:4053-4060; Winter documento US 5.225.539. Winter describe un método de injerto de CDR que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados de la presente invención (solicitud de patente británica GB 2188638A, presentada el 26 de marzo de 1987; Winter documento US 5.225.539).

35 También están dentro del alcance de la invención anticuerpos humanizados en los que se han sustituido, delecionado o añadido aminoácidos específicos. Los criterios para seleccionar aminoácidos a partir del donante se describen en el documento US 5.585.089, por ejemplo, columnas 12-16 del documento US 5.585.089, por ejemplo, columnas 12-16 del documento US 5.585.089. Otras técnicas para humanizar anticuerpos se describen en Padlan *et al.* documento EP 519596 A1, publicado el 23 de diciembre de 1992.

45 El anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena sencilla. Un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) puede diseñarse por ingeniería genética (véanse, por ejemplo, Colcher, D. *et al.* (1999) Ann N Y Acad Sci 880:263-80; y Reiter, Y. (1996) Clin Cancer Res 2:245-52). El anticuerpo de cadena sencilla puede dimerizarse o multimerizarse para generar anticuerpos multivalentes que tienen especificidades para diferentes epítopos de la misma proteína diana.

50 En aún otras realizaciones, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada elegida de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; particularmente, elegida de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada (por ejemplo, humanas) de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otra realización, el anticuerpo tiene una región constante de cadena ligera elegida de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena ligera (por ejemplo, humanas) de kappa o lambda. La región constante puede alterarse, por ejemplo, mutarse, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir uno o más de: unión al receptor de Fc, glicosilación del anticuerpo, el número de residuos de cisteína, la función de la célula efectora o función del complemento). En una realización, el anticuerpo tiene función efectora y puede fijar el complemento. En otras realizaciones, el anticuerpo no recluta células efectoras o fija el complemento. En otra realización, el anticuerpo tiene capacidad reducida o nula para unirse a un receptor de Fc. Por ejemplo, es un isotipo o subtipo, fragmento u otro mutante, que no admite la unión a un receptor de Fc, por ejemplo, tiene una región de unión al receptor de Fc mutagenizada o delecionada.

60 Los métodos para alterar una región constante de anticuerpo se conocen en la técnica. Los anticuerpos con función alterada, por ejemplo, afinidad alterada para un ligando efector, tal como FcR en una célula o el componente C1 del complemento, pueden producirse reemplazando al menos un residuo de aminoácido en la parte constante del anticuerpo con un residuo diferente (véanse, por ejemplo, el documento EP 388.151 A1, la patente estadounidense n.º 5.624.821 y la patente estadounidense n.º 5.648.260. Pueden describirse tipos de alteraciones similares que, si se aplican a la inmunoglobulina murina o de otra especie, reducirían o eliminarían estas funciones.

65

Un anticuerpo puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Tal como se usa en el presente documento, una molécula de anticuerpo "derivatizado" es una que se ha modificado. Los métodos de derivatización incluyen, pero no se limitan a, la adición de un resto fluorescente, un radionucleótido, una toxina, una enzima o un ligando de afinidad tal como biotina. Por consiguiente, las moléculas de anticuerpo de la invención pretenden incluir formas derivatizadas y modificadas de otro modo de los anticuerpos descritos en el presente documento, incluyendo moléculas de inmunoadhesión. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede unirse de manera funcional (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares distintas, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Un tipo de molécula de anticuerpo derivatizado se produce reticulando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de reticulación incluyen los que son heterobifuncionales, que tiene dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Tales agentes de reticulación están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Una molécula de anticuerpo puede conjugarse con otra entidad molecular, normalmente un marcador o un agente o resto terapéutico (por ejemplo, un citotóxico o citostático). Los isótopos radiactivos pueden usarse en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Tales isótopos radiactivos incluyen, pero no se limitan a, yodo (131I o 125I), itrio (90Y), lutecio (177Lu), actinio (225Ac), praseodimio, ástato (211At), renio (186Re), bismuto (212Bi o 213Bi), indio (111In), tecnecio (99mTc), fósforo (32P), rodio (188Rh), azufre (35S), carbono (14C), tritio (3H), cromo (51Cr), cloro (36Cl), cobalto (57Co o 58Co), hierro (59Fe), selenio (75Se) o galio (67Ga). Los radioisótopos útiles como marcadores, por ejemplo, para su uso en diagnóstico, incluyen yodo (131I o 125I), indio (111In), tecnecio (99mTc), fósforo (32P), carbono (14C) y tritio (3H), o uno o más de los isótopos terapéuticos enumerados anteriormente.

La invención proporciona moléculas de anticuerpo radiomarcadas y métodos de marcado de las mismas. En una realización, se divulga un método de marcado de una molécula de anticuerpo. El método incluye poner en contacto una molécula de anticuerpo, con un agente quelante, para producir de ese modo un anticuerpo conjugado. El anticuerpo conjugado está radiomarcado con un radioisótopo, por ejemplo, indio-111, itrio-90 y lutecio-177, para producir de ese modo una molécula de anticuerpo marcada.

El término "Dps" o "proteína de unión de ADN de células privadas de nutrientes" se refiere a una proteína de la superfamilia de ferritina que puede caracterizarse por las entradas con el número de registro Q0P891 (*C. jejuni*) y/o A0A0Q2JBU3 (*C. coli*) en la base de datos UniProtKB. Dps preferiblemente se refiere a la Dps de *C. jejuni* y/o la Dps de *C. coli*.

En una realización preferida, el anticuerpo no produce ninguna señal en un inmunoensayo tipo sándwich en ausencia de Dps y/o el anticuerpo puede detectar menos de 3 ng/ml de Dps cuando se usa en un inmunoensayo tipo sándwich. Preferiblemente, el inmunoensayo tipo sándwich es un ensayo inmunocromatográfico. Más preferiblemente, los dos anticuerpos usados en el inmunoensayo tipo sándwich son el anticuerpo de la presente invención. En la tabla 1 de los ejemplos, CL30Camp en combinación con CL30Camp no produce ruido de fondo cuando se aplica una muestra que comprende PBS + BSA al 0,1% al dispositivo de prueba inmunocromatográfico. En las tablas 2 y 3 de los ejemplos, se muestra que el dispositivo de prueba inmunocromatográfico detecta menos de 3 ng/ml de Dps de *C. jejuni* y *C. coli*.

En una realización preferida, el anticuerpo puede detectar menos de 3 ng/ml de Dps cuando se usa en un inmunoensayo tipo sándwich, preferiblemente un ensayo inmunocromatográfico. Preferiblemente, el anticuerpo puede detectar menos de 2 ó 1,5 ng/ml de Dps. Más preferiblemente, el anticuerpo puede detectar menos de 1 ng/ml de Dps.

En una realización preferida, el anticuerpo se obtiene o puede obtenerse inmunizando un animal con Dps nativa o recombinante. En una realización alternativa, el anticuerpo se obtiene o puede obtenerse inmunizando un animal con un inmunogen que comprende SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 12. En una realización preferida, el anticuerpo se une específicamente a SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 11 es la Dps de *C. jejuni* y tiene la siguiente secuencia:

```
MSVTKQLLQM QADAHHLWVKFHNYHWNVKG LQFFSIHEYTEKAYEEMAELFDSCAERVLQLGEK
AITCQKVL MENAKSPKVAKDCFTPLEVIELIKQDY EYLLAEFKKLNEAAEKESDTTTAAFAQENIAKY
EKSLWMIGATLQGACKM
```

SEQ ID NO: 12 es la Dps de *C. coli* y tiene la siguiente secuencia:

MSVTKQLLQMQADAHHLWVKFHNYHWNVKGQLFYSHIHEYTEKAYEEMAELFDNCAERALQLGEK  
 AITCQKTLMENAKSPKVEKDCFTPVEVMELIKKDYEYLLAEFKKLNEEAEKASDTTTAAFAQENIAK  
 YEKSLWMLASVLQNTCKM

En una realización preferida, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), en el que dicha VL comprende polipéptidos de LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y VH comprende polipéptidos de HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que LCDR1 es SASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 1), LCDR2 es RTSNLAS (SEQ ID NO: 2), LCDR3 es QQWSGYPFT (SEQ ID NO: 3), HCDR1 es GFSLTSSGVH (SEQ ID NO: 4), HCDR2 es VIWRGGSTDYNAAFMS (SEQ ID NO: 5) y HCDR3 es NYYYGTSPDYFDY (SEQ ID NO: 6).

SEQ ID NO: 7 es el fragmento de VL presente en CL30Camp y tiene la siguiente secuencia:

ENVLTQSPAIMAASLGQKVTMTCSASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKPLIHRTSNLASGVPARFSG  
 SGGTSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPFTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 8 es el fragmento de VH presente en CL30Camp y tiene la siguiente secuencia:

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTSSGVHWRQSPGKGLEWLGVIWRGGSTDYNAAF  
 MSRLSITKDNSKSKVFFKMNSLQPDDTAIYYCAKNYYYGTSPDYFDYWGQGTTLTVSS

En una realización preferida, el anticuerpo comprende una VL y una VH, en el que la VL es SEQ ID NO: 7 y la VH es SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 9 es la LC presente en CL30Camp y tiene la siguiente secuencia:

ENVLTQSPAIMAASLGQKVTMTCSASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKPLIHRTSNLASGVPARFSG  
 SGGTSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPFTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGA  
 SVVCFLNFPKIDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCE  
 ATHKTSTSPIVKSFNREK

SEQ ID NO: 10 es la HC presente en CL30Camp y tiene la siguiente secuencia:

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTSSGVHWRQSPGKGLEWLGVIWRGGSTDYNAAF  
 MSRLSITKDNSKSKVFFKMNSLQPDDTAIYYCAKNYYYGTSPDYFDYWGQGTTLTVSSAKTTPPS  
 VYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS  
 STWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTVCV  
 VVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA  
 AFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYK  
 NTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

En una realización preferida, el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), y la LC es SEQ ID NO: 9 y la HC es SEQ ID NO: 10. En una realización preferida, el anticuerpo comprende dos LC y dos HC, en el que las LC son SEQ ID NO: 9 y las HC son SEQ ID NO: 10.

El anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo anti-Dps puede estar marcado. El marcado puede realizarse usando cualquier método habitual. La sustancia de marcado usada para marcar es preferiblemente una partícula insoluble. Los ejemplos de partículas adecuadas incluyen: partículas de polímero sintético coloreadas obtenidas mediante el marcado con moléculas de colorante de polímeros sintéticos tales como látex, polietileno, polipropileno, poliestireno, un copolímero de estireno-butadieno, poli(cloruro de vinilo), poli(acetato de vinilo), poli(acrilamida), polimetacrilato, un copolímero de estireno-metacrilato, poli(metacrilato de glicidilo) y un copolímero de dimetacrilato de acroleína-etilenglicol; partículas metálicas coloidales (oro, plata, cobre, hierro, platino, paladio, y una mezcla de los mismos (por ejemplo, una mezcla de oro y platino, una mezcla de oro y plata, y una mezcla de paladio y platino)); y glóbulos rojos. Preferiblemente, la partícula permite que un cambio se compruebe fácil y rápidamente mediante inspección visual. Las partículas de polímero sintético coloreadas o partículas metálicas coloidales pueden usarse para este fin. Las partículas tienen un tamaño de partícula de, por ejemplo, de 15 a 400 nm, preferiblemente de 100 a 400 nm para partículas de polímero

sintético coloreadas, o de 30 a 80 nm para partículas metálicas coloidales. Las partículas metálicas coloidales pueden ser productos comercialmente disponibles, o pueden prepararse usando un método habitual.

5 En el caso de marcado con partículas metálicas coloidales, se añaden normalmente de 0,1 a 100 mg, preferiblemente de 0,5 a 20 mg de anticuerpo anti-Dps a 1 l de una disolución de partículas metálicas coloidales (normalmente, una absorbancia de aproximadamente 2,0 a 540 nm), y la mezcla se refrigera, o se agita a temperatura ambiente durante de 5 minutos a 24 horas. Después del bloqueo con albúmina sérica bovina (BSA; normalmente de 0,01 a 10 g, preferiblemente de 0,1 a 2 g), se centrifuga la disolución, y el precipitado resultado se obtiene como anticuerpos anti-Dps marcados con las partículas metálicas coloidales.

10 En una realización preferida, el anticuerpo está marcado con una partícula de polímero sintético coloreada y/o una partícula metálica coloidal. Preferiblemente, la partícula de polímero sintético coloreada comprende poliestireno.

#### 15 Dispositivo de prueba inmunocromatográfico

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo de prueba inmunocromatográfico que comprende: (a) un primer anticuerpo que se une específicamente a Dps, (b) un segundo anticuerpo que se une específicamente a Dps, y (c) una membrana de soporte, en el que el primer anticuerpo está inmovilizado en la membrana de soporte y el segundo anticuerpo está marcado.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "inmovilizar" se refiere a la unión de un anticuerpo en un soporte tal como una membrana de manera que el anticuerpo ya no puede moverse de su posición en el soporte. El primer anticuerpo es un anticuerpo de captura, y constituye una sección de detección al estar inmovilizado en el soporte. Tal como se usa en el presente documento, "sección de detección" se refiere a un sitio en el que la presencia de un antígeno se detecta capturando el antígeno de muestra que está unido a o se une al segundo anticuerpo.

25 La membrana de soporte puede ser de cualquier material que permita que el primer anticuerpo se inmovilice a través de interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas o acoplamiento químico, y en la que sustancias tales como la muestra y el segundo anticuerpo puedan moverse al sitio de detección. Los ejemplos de membranas de soporte adecuadas incluyen nitrocelulosa, poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) y acetato de celulosa.

30 En una realización preferida, la membrana de soporte comprende una sección de control para comprobar si la muestra se ha desarrollado de manera apropiada. Una sustancia que puede unirse a una sustancia de control se inmoviliza en la sección de control. Las ubicaciones de la sección de detección y la sección de control en el soporte no están particularmente limitadas. Normalmente, la sección de control está aguas abajo de la sección de detección.

35 En el dispositivo de prueba de la presente invención, una muestra líquida que cae sobre la sección de adición de muestra del dispositivo se mueve hacia una sección del dispositivo que comprende el segundo anticuerpo, y la mezcla de la muestra y el anticuerpo marcado migra a través de la membrana de soporte, y la señal se desarrolla en el sitio de detección (véase la figura 1A). El antígeno y el anticuerpo marcado forman un inmunocomplejo cuando la muestra contiene Dps. En la sección de detección, el primer anticuerpo captura el complejo a través de una interacción antígeno-anticuerpo, y el conjugado se acumula y desarrolla color. A continuación, la presencia o ausencia de antígeno en la muestra puede determinarse mediante comprobación visual del grado del color en la sección de detección. Cuando el soporte tiene una sección de control, el dispositivo de prueba puede comprender además una sustancia marcada de control en o adyacente a la sección del dispositivo que comprende el segundo anticuerpo. La sustancia marcada de control puede capturarse mediante una sustancia que se une a la sustancia marcada de control en la sección de control, y la sustancia marcada de control se acumula y desarrolla color. Cuando el segundo anticuerpo también se usa como sustancia marcada de control, el segundo anticuerpo residual que no formó un complejo con el antígeno en la muestra pasa a través del sitio de detección, y se captura mediante una sustancia que está inmovilizada en la sección de control aguas abajo. El anticuerpo marcado se acumula y desarrolla color.

40 En una realización, el primer anticuerpo es el anticuerpo de la presente invención, es decir, una cualquiera de las realizaciones de anticuerpo divulgadas previamente. En una realización alternativa, el segundo anticuerpo es el anticuerpo de la presente invención. En una realización preferida, tanto el primer como el segundo anticuerpo son el anticuerpo de la presente invención. Más preferiblemente, el primer y el segundo anticuerpo comprenden una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), en los que dicha VL comprende polipéptidos de LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y VH comprende polipéptidos de HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en los que LCDR1 es SASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 1), LCDR2 es RTSNLAS (SEQ ID NO: 2), LCDR3 es QQWSGYPFT (SEQ ID NO: 3), HCDR1 es GFSLTSSGVH (SEQ ID NO: 4), HCDR2 es VIWRGGSTDYNAAFMS (SEQ ID NO: 5) y HCDR3 es NYYYYGTSPDYFDY (SEQ ID NO: 6). Incluso más preferiblemente, el primer y el segundo anticuerpo comprenden una VL y una VH, en los que la VL es SEQ ID NO: 7 y la VH es SEQ ID NO: 8. Lo más preferiblemente, el primer y el segundo anticuerpo comprenden una LC y una HC, en los que la LC es SEQ ID NO: 9 y la HC es SEQ ID NO: 10.

En una realización preferida, el segundo anticuerpo está marcado, preferiblemente con una partícula de polímero sintético coloreada y/o una partícula metálica coloidal. Más preferiblemente, el segundo anticuerpo está marcado con una partícula de polímero sintético coloreada.

5 Método

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar bacterias del género *Campylobacter* en una muestra aislada que comprende poner en contacto la muestra con el dispositivo de prueba de la presente invención.

10 En una realización preferida, la bacteria del género *Campylobacter* es de la especie *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter coli*.

15 En una realización preferida, la muestra aislada es una muestra de heces aislada. La muestra de heces puede prepararse dispersando una muestra de heces en un tampón base de Tris a pH 8,4 antes de poner en contacto la muestra con el dispositivo de prueba de la presente invención.

Usos del anticuerpo

20 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo de la presente invención para la detección de bacterias del género *Campylobacter*. Preferiblemente, la bacteria del género *Campylobacter* es de la especie *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter coli*.

25 En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención se usa para detectar bacterias del género *Campylobacter* en una muestra de heces. Preferiblemente, la bacteria del género *Campylobacter* es de la especie *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter coli*.

30 En un quinto aspecto, la presente solicitud proporciona el uso del anticuerpo de la presente invención para la fabricación de un dispositivo de prueba de inmunoensayo. El término "dispositivo de prueba de inmunoensayo" puede referirse a cualquier dispositivo de prueba que comprende al menos un anticuerpo. Los ejemplos de dispositivos de prueba incluyen dispositivos de prueba inmunocromatográficos, dispositivos de prueba de ELISA y dispositivos de prueba de inmunoprecipitación. A continuación, el dispositivo de prueba de inmunoensayo puede usarse en un método para detectar bacterias del género *Campylobacter* en una muestra aislada que comprende poner en contacto la muestra con el dispositivo de prueba de inmunoensayo. Preferiblemente, la bacteria del género *Campylobacter* es de la especie *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter coli*. Más preferiblemente, la bacteria del género *Campylobacter* es de la especie *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter coli* y la muestra aislada es una muestra de heces aislada.

40 En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención se usa para fabricar el dispositivo de prueba inmunocromatográfico de la presente invención.

Hibridoma

45 En un sexto aspecto, la presente divulgación proporciona un hibridoma que produce el anticuerpo de la presente invención.

50 Los anticuerpos monoclonales pueden generarse inmunizando ratones con un antígeno derivado de Dps. Los esplenocitos de estos ratones inmunizados con el antígeno de interés se usan para producir hibridomas que secretan Acm con afinidades específicas para epítomos (véanse, por ejemplo, Wood *et al.* solicitud internacional WO 91/00906, Kucherlapati *et al.* publicación PCT WO 91/10741; Lonberg *et al.* solicitud internacional WO 92/03918; Kay *et al.* solicitud internacional 92/03917; Lonberg, N. *et al.* 1994 Nature 368:856-859; Green, L.L. *et al.* 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S.L. *et al.* 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggeman *et al.* 1993 Year Immunol 7:33-40; Tuailon *et al.* 1993 PNAS 90:3720-3724; Bruggeman *et al.* 1991 Eur J Immunol 21:1323-1326).

55 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a Dps

60 Se obtuvo anticuerpo monoclonal CL30Camp a partir del hibridoma del mismo nombre. De manera breve, se obtuvo un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal CL30Camp realizando protocolos convencionales conocidos en la técnica (KOHLENER G Milstein C Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity Nature 7 de agosto de 1975 0028-0836 256 5517 495-497).

65 Se inmunizaron ratones de tipo BALB/c con Dps nativa purificada (la Dps nativa purificada se obtuvo a través de los métodos descritos en Ishikawa *et al.*, 2003. J. Bacteriol. 185(3): 1010-1017). Se fusionaron linfocitos de ratones

5 inmunizados con una línea celular de mieloma, específicamente una línea celular SP20, y los hibridomas que se obtuvieron se cribaron mediante ELISA para encontrar clones que producen anticuerpos que se unen a Dps. Para realizar el ELISA, se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con un anticuerpo anti-Dps policlonal de conejo en tampón carbonato 100 mM, pH 9 a 37°C durante 2 h. Se lavaron los pocillos y después se añadió una disolución de Dps en PBS que contenía BSA (albúmina sérica bovina) al 1% (p/v). Se lavaron de nuevo los pocillos y después se añadió el sobrenadante de un cultivo de línea celular de hibridoma a cada pocillo. La presencia de anticuerpos que pueden unirse a Dps se reveló usando un conjugado de peroxidasa anti-IgG de ratón (Sigma-Aldrich) y el correspondiente sustrato.

10 Se seleccionaron los hibridomas que secretaron anticuerpos con alta especificidad y afinidad para Dps. Entre los hibridomas seleccionados, se seleccionaron adicionalmente los que produjeron buenos títulos de anticuerpo que funcionaron favorablemente en pruebas de estrés térmico.

15 Los anticuerpos se purificaron usando cromatografía de afinidad de proteína A usando métodos que son comunes en la técnica (véase el manual "Affinity Chromatography vol. 1: Antibodies" 18103746 AF publicado en 04/2016 por GE Healthcare Bio-Sciences AB).

20 Se seleccionó CL30Camp porque tenía alta especificidad y sensibilidad en pruebas de ELISA así como en pruebas de inmunocromatografía (tabla 1, la muestra usada fue PBS que contenía BSA al 0,1% (p/v)).

Tabla 1: Estudio del ruido de fondo de diferentes combinaciones de anticuerpos aislados

	CL18Camp	CA29	CL30Camp	CA32	Marcado
CL18Camp	+/-	+/-	-	+/-	
CA29	+	+	+/-	+	
CL30Camp	-	-	-	+/-	
CA32	+/-	+/-	+/-	+	
Inmovilizado					

25 Ejemplo 2: Preparación del anticuerpo conjugado

Se marcaron anticuerpos anti-Dps con nanopartículas de poliestireno coloreadas (K1 020 Estapor®, Merck, Darmstadt, Alemania). Las nanopartículas coloreadas comprendían grupos carboxilo en la superficie y tenían un diámetro promedio de alrededor de 300 nm. Los anticuerpos se marcaron de la siguiente manera: se lavó una disolución de 1 ml que contenía el 10% (p/v) de partículas, se centrifugó y se resuspendió en un tampón MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) 10 mM con un pH de 6,0. Después se añadió EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) hasta una concentración final de 5 mM. Se incubó la disolución durante 1 hora a 37°C y después se retiró el reactivo en exceso centrifugando la disolución y retirando el sobrenadante.

35 Se resuspendieron las partículas activadas en MES 10 mM, pH 6, y se añadió el anticuerpo a una concentración de superficie de 2 mg/m<sup>2</sup>. A continuación, se incubó la disolución durante 4 horas a 25°C y después se lavaron los anticuerpos marcados con una disolución que contenía Tween-20 al 0,1% (p/v). Se diluyeron los anticuerpos marcados en una disolución de tampón de Tris (tris(hidroxi metil)aminometano) al 0,05% (p/v), pH 8,0, que contenía sacarosa al 10% (p/v), BSA al 2% (p/v), PEG-6000 al 1% (p/v) y Tween-20 al 2% (p/v).

40 Se depositó esta disolución a una velocidad de 15 µl/cm sobre fibras de poliéster tejidas con una anchura de 29 mm. Se secaron las fibras de poliéster durante 24 horas en una cámara a 30°C y humedad relativa del 20%.

Ejemplo 3: Preparación de las secciones de detección y de control

45 Se depositó un tampón de PBS que contenía 1 mg/ml de anticuerpo anti-Dps de manera lineal sobre una membrana de nitrocelulosa que tenía una anchura de laminado de 25 mm y un tamaño de poro de entre 10 y 30 micrómetros. Se depositó la disolución de anticuerpos a una velocidad de 1 µl/cm. A continuación, se secó la membrana durante 24 horas en una cámara a 30° C y humedad relativa del 20%.

50 Se depositó anticuerpo anti-IgG de ratón de conejo policlonal en la sección de control a la vez que el depósito del anticuerpo anti-Dps en la sección de detección. Se usaron las mismas condiciones para el depósito del anti-IgG de ratón de conejo policlonal en la membrana de nitrocelulosa.

55 Ejemplo 4. Montaje del dispositivo de prueba inmunocromatográfico

Se montaron el material conjugado (sección de adición de muestra y sección que comprende el anticuerpo marcado), la membrana de soporte y el material absorbente tal como se indica en la figura 1B y 1C sobre un soporte de plástico con una lámina adhesiva. Las tiras se cortaron de manera transversal a una anchura de 4 mm.

La disolución usada para dispersar las muestras de heces consistía en una disolución acuosa de tampón de Tris 200 mM con un pH de 8,4. Esta disolución de dispersión se dispensó en viales para muestreo. Cada vial contenía 1 ml de disolución.

5 Ejemplo 5: Límite de detección del dispositivo de prueba para Dps de *C. jejuni* y *C. coli*

Se prepararon diluciones en serie 1/2 de Dps en la disolución de dispersión descrita anteriormente. Se aplicaron 100 µl de una muestra a un dispositivo de prueba inmunocromatográfico de la invención. Se permitió que el dispositivo de prueba se desarrollara durante 10 minutos a temperaturas ambiente antes de que los resultados se evaluaran de manera visual. Se realizó el mismo experimento diluyendo Dps en muestras de heces dispersadas en el mismo tampón. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3. Interpretación: + = respuesta positiva; - = respuesta negativa; +/- = respuesta positiva débil.

15 Tabla 2: Límite de detección del dispositivo de prueba para Dps de *C. jejuni*

	1,85 ng/ml	0,92 ng/ml	0,46 ng/ml	0,23 ng/ml	0,115 ng/ml	0,057 ng/ml
CL30Camp/CL30Camp	+	+	+ débil	-	-	-

Tabla 3: Límite de detección del dispositivo de prueba para Dps de *C. coli*

	3 ng/ml	1,5 ng/ml	0,75 ng/ml	0,375 ng/ml	0,187 ng/ml
CL30Camp/CL30Camp	+	+ débil	+/-	-	-

20 Ejemplo 6: Detección de falsos positivos

Se dispersaron 20 mg de muestra de heces que se demostró que eran positivos o negativos para *C. coli* o *C. jejuni* en 1 ml de la disolución de dispersión descrita en el ejemplo 4. Se aplicaron 100 µl de una muestra a un dispositivo de prueba inmunocromatográfico de la invención. Se permitió que el dispositivo de prueba se desarrollara durante 10 minutos a temperaturas ambiente antes de que los resultados se evaluaran de manera visual. Interpretación: + = respuesta positiva; - = respuesta negativa; +/- = respuesta positiva débil.

Tabla 4: Reactividad del dispositivo de prueba con muestras que no contienen *C. jejuni* ni *C. coli*

	Muestras negativas										
	10690	11485	4471	11160	4488	10726	4468	4484	4466	10770	10977
CL30Camp/CL30Camp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

30 Tabla 5: Reactividad del dispositivo de prueba con muestras que contienen *C. jejuni* o *C. coli*

	Muestras positivas				
	3626	3628	3640	3631	3622
CL30Camp/CL30Camp	+	+	+	+	+

35 **Lista de secuencias**

<110> Certest Biotec SL

<120> Anticuerpos y dispositivos de prueba para la detección de bacterias del género *Campylobacter*

40 <130> HE-Ref: 902 327

<160> 12

45 <170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> LCDR1

<400> 1

ES 2 759 622 T3

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His  
 1 5 10  
 <210> 2  
 <211> 7  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> LCDR2  
 10 <400> 2  
 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5  
 <210> 3  
 15 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> LCDR3  
 <400> 3  
 Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Phe Thr  
 1 5  
 25 <210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> HCDR1  
 <400> 4  
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser Ser Gly Val His  
 35 1 5 10  
 <210> 5  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> HCDR2  
 45 <400> 5  
 Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 6  
 <211> 13  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> HCDR3  
 55 <400> 6  
 Asn Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 7  
 60 <211> 108

ES 2 759 622 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Fragmento de VL de CL30Camp

<400> 7  
 Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ala Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Pro Leu  
 35 40 45  
 Ile His Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro  
 85 90 95  
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 8  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Fragmento de VH de CL30Camp

<400> 8  
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Ser  
 20 25 30  
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Lys Asn Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

20 <210> 9  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> LC de CL30Camp

<400> 9

ES 2 759 622 T3

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ala Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Pro Leu  
 35 40 45  
 Ile His Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro  
 85 90 95  
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala  
 100 105 110  
 Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp  
 130 135 140  
 Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met  
 165 170 175  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser  
 180 185 190  
 Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys  
 195 200 205  
 Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

<210> 10  
 <211> 445  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> HC de CL30Camp

10 <400> 10

ES 2 759 622 T3

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
1 5 10 15  
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Ser  
20 25 30  
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45  
Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met  
50 55 60  
Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
65 70 75 80  
Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95  
Lys Asn Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110  
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser  
115 120 125  
Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val  
130 135 140  
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
145 150 155 160  
Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
165 170 175  
Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro  
180 185 190  
Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro  
195 200 205  
Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly  
210 215 220  
Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile  
225 230 235 240  
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys  
245 250 255  
Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln  
260 265 270  
Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln  
275 280 285  
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu  
290 295 300  
Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg  
305 310 315 320  
Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
325 330 335  
Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro  
340 345 350  
Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr  
355 360 365  
Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln  
370 375 380  
Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly  
385 390 395 400  
Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu  
405 410 415  
Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn  
420 425 430  
His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 11  
<211> 149  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 759 622 T3

<220>

<223> Dps de *Campylobacter jejuni*

<400> 11

Met Ser Val Thr Lys Gln Leu Leu Gln Met Gln Ala Asp Ala His His  
 1 5 10 15  
 Leu Trp Val Lys Phe His Asn Tyr His Trp Asn Val Lys Gly Leu Gln  
 20 25 30  
 Phe Phe Ser Ile His Glu Tyr Thr Glu Lys Ala Tyr Glu Glu Met Ala  
 35 40 45  
 Glu Leu Phe Asp Ser Cys Ala Glu Arg Val Leu Gln Leu Gly Glu Lys  
 50 55 60  
 Ala Ile Thr Cys Gln Lys Val Leu Met Glu Asn Ala Lys Ser Pro Lys  
 65 70 75 80  
 Val Ala Lys Asp Cys Phe Thr Pro Leu Glu Val Ile Glu Leu Ile Lys  
 85 90 95  
 Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Leu Ala Glu Phe Lys Lys Leu Asn Glu Ala  
 100 105 110  
 Ala Glu Lys Glu Ser Asp Thr Thr Thr Ala Ala Phe Ala Gln Glu Asn  
 115 120 125  
 Ile Ala Lys Tyr Glu Lys Ser Leu Trp Met Ile Gly Ala Thr Leu Gln  
 130 135 140  
 Gly Ala Cys Lys Met  
 145

5

<210> 12

<211> 149

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dps de *Campylobacter coli*

15 <400> 12

Met Ser Val Thr Lys Gln Leu Leu Gln Met Gln Ala Asp Ala His His  
 1 5 10 15  
 Leu Trp Val Lys Phe His Asn Tyr His Trp Asn Val Lys Gly Leu Gln  
 20 25 30  
 Phe Tyr Ser Ile His Glu Tyr Thr Glu Lys Ala Tyr Glu Glu Met Ala  
 35 40 45  
 Glu Leu Phe Asp Asn Cys Ala Glu Arg Ala Leu Gln Leu Gly Glu Lys  
 50 55 60  
 Ala Ile Thr Cys Gln Lys Thr Leu Met Glu Asn Ala Lys Ser Pro Lys  
 65 70 75 80  
 Val Glu Lys Asp Cys Phe Thr Pro Val Glu Val Met Glu Leu Ile Lys  
 85 90 95  
 Lys Asp Tyr Glu Tyr Leu Leu Ala Glu Phe Lys Lys Leu Asn Glu Glu  
 100 105 110  
 Ala Glu Lys Ala Ser Asp Thr Thr Thr Ala Ala Phe Ala Gln Glu Asn  
 115 120 125  
 Ile Ala Lys Tyr Glu Lys Ser Leu Trp Met Leu Ala Ser Val Leu Gln  
 130 135 140  
 Asn Thr Cys Lys Met  
 145

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), en el que dicha VL comprende polipéptidos de LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y VH comprende polipéptidos de HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que LCDR1 es SASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 1), LCDR2 es RTSNLAS (SEQ ID NO: 2), LCDR3 es QQWSGYPFT (SEQ ID NO: 3), HCDR1 es GFSLTSSGVH (SEQ ID NO: 4), HCDR2 es VIWRGGSTDYNAAFMS (SEQ ID NO: 5) y HCDR3 es NYYYGTSPDYFDY (SEQ ID NO: 6), y se une específicamente a la proteína de unión de ADN de células privadas de nutrientes (Dps) de *Campylobacter coli* y/o *Campylobacter jejuni*.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una VL y una VH, en el que la VL es SEQ ID NO: 7 y la VH es SEQ ID NO: 8.
3. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), y la LC es SEQ ID NO: 9 y la HC es SEQ ID NO: 10.
4. Dispositivo de prueba inmunocromatográfico que comprende:
  - (a) un primer anticuerpo que se une específicamente a Dps (proteína de unión de ADN de células privadas de nutrientes);
  - (b) un segundo anticuerpo que se une específicamente a Dps (proteína de unión de ADN de células privadas de nutrientes); y
  - (c) una membrana de soporte,
 en el que el primer anticuerpo está inmovilizado en la membrana de soporte y el segundo anticuerpo está marcado, y en el que el primer anticuerpo es el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y/o el segundo anticuerpo es el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Dispositivo de prueba según la reivindicación 4, en el que el segundo anticuerpo está marcado con una partícula de polímero sintético coloreada y/o una partícula metálica coloidal.
6. Dispositivo de prueba según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo está marcado con una partícula de polímero sintético coloreada que comprende poliestireno.
7. Método para detectar bacterias del género *Campylobacter* en una muestra aislada que comprende poner en contacto la muestra con el dispositivo de prueba según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la bacteria del género *Campylobacter* es *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter coli*.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que la muestra aislada es una muestra de heces aislada.
10. Uso *in vitro* del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la detección de bacterias del género *Campylobacter*.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que la bacteria del género *Campylobacter* es *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter coli*.

Figura 1

