



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 349 204**

② Número de solicitud: 200700625

⑤ Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)      **C07K 16/12** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)      **C12N 5/12** (2006.01)  
**G01N 33/02** (2006.01)      **G01N 33/569** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)      **C12R 1/42** (2006.01)  
**C12R 1/91** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **09.03.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**29.12.2010**

⑰ Solicitante/s: **Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea  
Bº de Sarriena, s/n  
UPV/EHU - Campus de Leioa  
48940 Leioa, Vizcaya, ES  
Instituto de Salud Carlos III**

⑱ Inventor/es: **Echeita Sarrionaindia, Aurora;  
Garaizar Candina, Javier;  
Rementería Ruiz, Aitor;  
Vivanco Gómez, Ana Belén y  
Herrera León, Silvia**

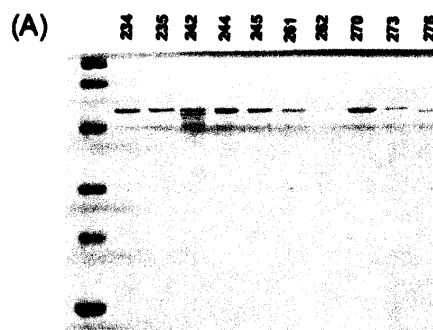
⑳ Agente: **Ungría López, Javier**

⑳ Título: **Un anticuerpo monoclonal específico frente al antígeno H:1,2 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium que presenta reactividad cruzada con *Salmonella enterica* serotipo 4,5,12:i:-, línea celular productora, y su uso.**

㉑ Resumen:

Un anticuerpo monoclonal específico frente al antígeno H:1,2 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium que presenta reactividad cruzada con *Salmonella enterica* serotipo 4,5,12:i:-, línea celular productora, y su uso.

Esta invención se refiere a un anticuerpo monoclonal específico frente al antígeno H:1,2 presente en *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium con reactividad cruzada frente al serotipo 4,5,12:i:-, una línea celular murina productora de dicho anticuerpo monoclonal y la aplicación de dicho anticuerpo monoclonal mediante técnicas inmunológicas para reconocer antígenos asociados a flagelo específicos de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y *Salmonella enterica* serotipo 4,5,12:i:-.



ES 2 349 204 A1

## DESCRIPCIÓN

Un anticuerpo monoclonal específico frente al antígeno H:1,2 *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium que presenta reactividad cruzada con *Salmonella enterica* serotipo 4,5,12:i:-, línea celular productora, y su uso.

### Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer específicamente antígenos asociados a flagelos de *Salmonella*, a la obtención de una línea celular murina productora y a su aplicación mediante técnicas inmunológicas para la detección de dicho microorganismo.

### Estado de la técnica

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentra englobado entre los bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, cuyas características tanto biológicas como bioquímicas se describen en el Manual Bergey's. Se trata de uno de los agentes patógenos más ubicuos en la naturaleza, pudiendo encontrarse tanto en humanos, animales y alimentos, como en muestras ambientales. Este género constituye uno de los patógenos más importantes para el ser humano y los animales. Las enfermedades que produce, también denominadas salmonelosis, están relacionadas principalmente con la ingesta de alimentos o aguas contaminadas, aunque en ocasiones se han descrito casos asociados con la transmisión persona-persona. Es necesario destacar la importancia de los portadores asintomáticos como transmisores de dicha infección.

Se conocen dos especies denominadas *Salmonella enterica* y *S. bongori* que se diferencian por características bioquímicas y la primera se subdivide a su vez en varias subespecies. Dentro de estas especies la discriminación entre cepas y clones se basa principalmente en características de tres tipos de antígenos según el esquema de Kauffmann-White de serotipificación del género *Salmonella*. Estos tres tipos de antígenos son: antígeno somático (O), flagelar de primera fase (H1) y flagelar de segunda fase (H2). Los antígenos H (o flagelares) se encuentran en las subunidades proteicas de flagelina que conforman la estructura flagelar. En ocasiones también se identifica un cuarto antígeno capsular denominado Vi. En algunos casos, a bacterias pertenecientes a un serotipo o fórmula antigénica se le asigna un nombre común. A modo de ejemplo, la fórmula antigénica 4,5,12:i:1,2 corresponde al serotipo Typhimurium. Las cepas de *Salmonella* tienen la particularidad de poseer 2 tipos de flagelos, de primera y de segunda fase, que no se producen nunca a la vez en la misma célula. Una única bacteria de este género producirá uno de esos tipos de antígenos flagelares y tras sucesivas divisiones, alguna de las células hijas comenzará a producir flagelos del otro tipo. Por ello sólo se detecta uno de los dos tipos cuando se realiza la serotipificación y para identificar el otro se debe provocar un cambio de fase.

Los flagelos son polímeros de unas proteínas filamentosas denominadas flagelinas en las que reside la especificidad antigénica. La mayor parte de las bacterias del género *Salmonella* pueden expresar dos formas antigénicas de estas proteínas flagelares a las que se denominan fase 1 y fase 2. El antígeno flagelar puede presentarse alternativamente en fase 1 si se expresa el gen *fliC*, o en fase 2 si se expresa por el contrario el gen *fljB*. El fenómeno de cambio entre una fase y otra se denomina variación de fase y está regulado por fenómenos genéticos de inversión de las secuencias de los genes, actuando como interruptores que activan unos genes y desactivan los otros. Este fenómeno de variación de fase está muy bien estudiado en *Salmonella*, siendo regulado por factores ambientales y de presión inmunológica.

Puesto que existen más de 2.500 serotipos de *Salmonella* y solo algunos de ellos se suelen relacionar con patologías humanas, es muy útil obtener información sobre el tipo de *Salmonella* presente en una muestra. El serotipo de *Salmonella*, además del fagotipo o la información sobre su susceptibilidad anti microbiana son muy útiles para estimar el origen de la infección, para establecer relaciones entre diferentes muestras implicadas en el mismo brote o para predecir la gravedad de ciertas infecciones.

Cuatro son los serotipos predominantes de la especie *Salmonella enterica* aislados en España con mayor frecuencia: ser. Enteritidis, ser. Typhimurium, ser. Hadar y subsp. I ser. 4,5,12:i:-. Dentro del serotipo Typhimurium se encuentra el fagotipo DT104 que generalmente es multiresistente a agentes antimicrobianos y muestra un patrón de resistencia ACSSUT (ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamida y tetraciclina). Por otra parte, el serotipo monofásico *Salmonella enterica* subsp. I serotipo 4,5,12:i:- pertenece al fagotipo U302 de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, ha perdido aparentemente su operón genético de cambio de fase y el gen *fljB* y se está extendiendo rápidamente en España y a nivel mundial. Este serotipo también es resistente a los antimicrobianos.

En 1975, Kohler y Milstein descubrieron que ciertas líneas de células de ratón podían ser fusionadas con células de bazo de este animal para crear hibridomas, cada uno de ellos capaz de segregar anticuerpos de una especificidad única, es decir, anticuerpos monoclonales. Con la introducción de esta tecnología, resultó posible en algunos casos producir grandes cantidades de anticuerpos murinos específicos contra un determinante o determinantes particulares situados en antígenos.

Es de gran interés proporcionar métodos de ensayo por medio de los cuales se puedan detectar organismos del género *Salmonella*. En los últimos años, se han ideado ensayos inmunológicos en los que se generan anticuerpos monoclonales contra antígenos y que, por aprovechamiento de la unión específica entre ellos, sirven para poder detectar la presencia de dicho antígeno. Estas pruebas inmunoenzimáticas que utilizan anticuerpos monoclonales son fáciles

de realizar, rápidas y tienen un precio de coste asequible. Su mayor inconveniente puede residir en el hecho de que con cierta frecuencia dan falsas reacciones positivas y a veces falsas reacciones negativas.

5 Se sabe que *Salmonella* presenta estructuras sobre su superficie, como los flagelos, y que estos pueden ser antígenicamente distintos, es decir, que muestran epítomos específicos diferentes en los antígenos flagelares. Existen métodos para generar anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie de microorganismos que luego pueden ser aplicados en ensayos inmunológicos para su detección.

10 Existen documentos en la bibliografía del estado de la técnica (De Vries N. y cols., *Applied and Environmental Microbiology* 64: 5033-5038 (1998); Sojka M. y cols., *Veterinary Microbiology* 78: 61-77 (2001)) en los que se describe la producción de anticuerpos monoclonales frente a antígenos flagelares de primera fase H:i y de segunda fase H:1,2. Debemos reseñar que dentro del grupo de cepas de *Salmonella* que se utilizan para demostrar la especificidad de los mismos no aparecen representantes para todos los antígenos flagelares pertenecientes al complejo de segunda fase H1 (H:1,2; H:1,5; H:1,6 y H:1,7), los cuales presentan una elevada similitud entre sí, así como el bajo número de cepas examinadas. Por otra parte, destacar también el pequeño número de serotipos testados que presentan H:i como antígeno flagelar de primera fase. Debido a ello desconocemos si estos anticuerpos monoclonales presentan reactividad cruzada al ser enfrentados a los antígenos similares o no.

20 Nuestra invención proporciona una nueva línea celular que produce un anticuerpo monoclonal específico frente a *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y de forma cruzada frente a *Salmonella enterica* ser. 4,5,12:i:-, que no presenta reactividad cruzada cuando es enfrentado a antígenos flagelares pertenecientes al complejo antigénico H1 de segunda fase (H:1,2; H:1,5; H:1,6 y H:1,7). Tampoco presenta reactividad cruzada cuando es enfrentado a antígenos flagelares H:i de primera fase, ni a los antígenos flagelares de primera y de segunda fase de los serotipos de *Salmonella enterica* aislados más frecuentemente. Por último, tampoco se observa reactividad cruzada cuando es enfrentado a un grupo de microorganismos pertenecientes a otras especies.

30 Existen diferentes casas comerciales que distribuyen diferentes anticuerpos monoclonales frente a antígenos flagelares de *Salmonella*, mostrando la mayoría de ellos reactividad cruzada entre distintos serotipos y por tanto impidiendo la caracterización concreta del microorganismo. Otras casas comerciales no presentan datos de reactividad cruzada entre los distintos serotipos. Dentro de las casas comerciales que desarrollan esta serie de reactivos encontramos: Bio-design Internacional, Innotek, Novus Biologicals, Maine Biotechnology Services, Serotec, USBiological o Sifin. Por otra parte, dentro de los anticuerpos monoclonales frente a *Salmonella enterica* ser. Typhimurium que existen en el mercado, el inmunógeno que se ha utilizado para su producción es su antígeno flagelar de primera fase H:i. En la presente invención se ha utilizado un extracto de flagelo de segunda fase (H:1,2). Asimismo, no se ha encontrado en el mercado ningún anticuerpo monoclonal que presente reactividad frente a *Salmonella enterica* ser. 4,5,12:i:-.

### Breve descripción de las figuras

40 Las figuras muestran ejemplos de la interpretación de resultados positivos y negativos obtenidos mediante distintas técnicas inmunológicas empleadas para la caracterización del anticuerpo monoclonal producido, el cual ha demostrado ser específico para *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y *Salmonella enterica* ser. 4,5,12:i:-. Figura 1. Las muestras que aparecen en el gel de poliacrilamida al 12,5% teñido con azul de Coomassie (A) son extracciones de antígenos asociados a flagelos de distintos serotipos de *Salmonella*, y las mismas muestras fijadas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y analizadas mediante Western-Blot con el anticuerpo monoclonal objeto de la presente invención(B). Ambos geles han sido procesados simultáneamente. En la calle izquierda está el marcador de peso molecular. Los números de referencia indicados en los geles se corresponden con los recogidos en las tablas adjuntas en los ejemplos.

50 Figura 2. Las muestras que aparecen en la membrana de nitrocelulosa son extracciones de antígenos asociados a flagelos de distintos serotipos de *Salmonella* analizadas mediante Dot-Blot con el anticuerpo monoclonal objeto de la invención. Los números de referencia indicados en la membrana de PVDF se corresponden con los recogidos en las tablas adjuntas en los ejemplos.

### Descripción de la invención

55 Para una mejor comprensión del texto de la presente solicitud a continuación se definen una serie de términos de acuerdo con el sentido que poseen en la presente invención.

60 Así, un “anticuerpo” es una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas producida por células plasmáticas (derivadas de los linfocitos B) tras su exposición a un antígeno, y que reconoce específicamente a dicho antígeno, uniéndose selectivamente a él y así ayudando a su eliminación por otros componentes del sistema inmune. El cuerpo puede sintetizar una variedad prácticamente ilimitada de anticuerpos diferentes, siendo cada linfocito B genéticamente programado temprano en su desarrollo, para producir un anticuerpo de una única especificidad. Se habla de “anticuerpos policlonales” cuando proceden de diferentes clones celulares, de modo que reconocen distintas dianas en el antígeno, y de “anticuerpos monoclonales” cuando todos ellos proceden de un mismo clon celular, de modo que todos los anticuerpos reconocen una misma diana del antígeno.

## ES 2 349 204 A1

Los anticuerpos pueden dividirse en cinco clases funcionales o isotipos que son inmunoglobulinas M (IgM), inmunoglobulinas D (IgD), inmunoglobulinas G (IgG), inmunoglobulinas A (IgA), e inmunoglobulinas E (IgE), que están determinadas por el tipo de cadena pesada que las componen y que determinan su actividad funcional.

5 Las moléculas de anticuerpo tienen una forma de “Y”, con tres segmentos de tamaño semejante conectadas por un punto de unión flexible. Estas moléculas poseen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (más cortas), poseyendo a su vez ambas una región variable y una región constante. Las regiones carboxilo-terminales de las cadenas ligeras o pesadas son constantes en el mismo isotipo. Cada brazo de la “Y” está formado por la asociación de una cadena ligera con la mitad amino- terminal de la cadena pesada, mientras que el tronco de la “Y” está formado por la asociación de las mitades carboxilo-terminales de las dos cadenas pesadas.  
10

Se han empleado enzimas proteolíticas para determinar la estructura de la molécula de anticuerpo y las partes de la molécula que son responsables de sus diferentes funciones. Tras una digestión con papaína, se obtienen tres fragmentos: dos fragmentos idénticos denominados “fragmentos Fab” que poseen capacidad de unirse al antígeno que corresponden a los brazos de la “Y”, y un fragmento denominado “fragmento Fc”, que no posee capacidad de unión al antígeno, cristaliza con facilidad, y corresponde al tronco de la “Y”.  
15

La digestión con pepsina actúa en el lado carboxilo-terminal del puente disulfuro que une las dos cadenas pesadas, generando un “fragmento F(ab')<sub>2</sub>” que posee las mismas características de unión al antígeno que el anticuerpo original pero es incapaz de interactuar con otras moléculas efectoras por carecer de la región Fc.  
20

Por otro lado, mediante técnicas de ingeniería genética es posible generar “fragmentos Fv” que comprenden 15 aminoácidos de la región variable de la cadena ligera.

25 Por último de acuerdo con la presente invención el término “variante de un anticuerpo” se refiere a un anticuerpo modificado por ejemplo mediante la adición de un hapteno, un marcador fluorescente, mediante la sustitución de su región Fc por otra procedente de otra especie, etc. Modificaciones cuya realización resultan obvias para un experto en la materia.

30 Así, en primer lugar, la invención objeto de la presente solicitud se refiere a un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo que reacciona específicamente frente al antígeno flagelar H:1,2 presente en *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y que también reacciona frente al serotipo 4,5,12:i:-, caracterizado porque se obtiene por un procedimiento que comprende:

- 35 a) inmunizar un animal con el antígeno flagelar H:1,2 aislado;
- b) inmortalizar los linfocitos B procedentes de los ratones inmunizados en el paso anterior, mediante su fusión con células de mieloma para dar lugar a un hibridoma;
- 40 c) aislar aquellos clones de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales reactivos frente al antígeno flagelar H:1,2;
- d) cultivar dichos clones celulares y posterior obtención del anticuerpo de interés.

45 En una realización preferente de la presente invención dicho anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo está caracterizado porque dicho animal inmunizado está seleccionado entre: conejo, cabra y ratón.

50 En una realización concreta, el anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo objeto de la presente invención está caracterizado porque dicho anticuerpo posee un isotipo seleccionado entre: IgG, e IgM.

En una realización más preferente de la presente invención el hibridoma aislado en el paso c) anteriormente descrito es la línea celular 23D4, ECACC no. 05122301.

55 Además, en una realización todavía más preferente dicho anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo es murino. En una realización concreta dicho anticuerpo además es del isotipo IgM.

En una realización concreta el anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo objeto de la presente invención se encuentra en sobrenadante, ascites o purificado.

60 Como es conocido para un experto en la materia, una vez obtenido un hibridoma que secreta un anticuerpo monoclonal de interés (por un procedimiento similar al descrito en los ejemplos que aparecen a continuación), dicha secreción de anticuerpo se produce al medio de cultivo en el que se encuentra dicho hibridoma. Así, es posible emplear el propio sobrenadante de cultivo como reactivo en ensayos en los que se requiere la presencia del anticuerpo en cuestión. Otra técnica empleada con frecuencia consiste en inyectar las células del hibridoma en la cavidad abdominal de un animal de experimentación como un ratón, estas células crecen en dicha cavidad y secretan allí mismo anticuerpo, el cual se acumula en el líquido ascítico o ascites. Posteriormente este ascites se recupera y puede emplearse directamente en un ensayo de forma similar al sobrenadante de cultivo anteriormente descrito, con la ventaja  
65

## ES 2 349 204 A1

de que en este caso el anticuerpo se encuentra más concentrado. Por último, otra posibilidad es purificar el anticuerpo presente en cualquiera de los dos líquidos anteriores mediante una cromatografía, para su posterior uso en distintos ensayos.

5 Por otro lado, la presente invención se refiere a una línea celular capaz de producir un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente frente al antígeno H:1,2 presente en el serotipo Typhimurium y de forma cruzada con el serotipo 4,5,12:i:- de *Salmonella enterica* anteriormente descrito y caracterizada porque dicha línea celular es la línea 23D4, ECACC no. 05122301.

10 Adicionalmente la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo caracterizado porque reacciona específicamente frente al antígeno flagelar H:1,2 presente en *Salmonella enterica* serotipos Typhimurium y de forma cruzada con el serotipo 4,5,12:i-. En una realización preferente, dicho anticuerpo monoclonal es producido por la línea celular 23D4, ECACC no. 05122301.

15 En una realización concreta de la presente invención dicho fragmento de un anticuerpo monoclonal anteriormente descrito se caracteriza porque está seleccionado entre: un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> Y un fragmento Fv.

Por último, la presente invención se refiere también al uso de un anticuerpo, fragmento o variante del mismo anteriormente descritos, para detectar la presencia de los serotipos Typhimurium o 4,5,12:i:- de *Salmonella enterica* en una muestra. En una realización preferente dicha muestra está seleccionada entre una muestra alimentaria y una muestra clínica. En una realización más preferente dicha muestra clínica está seleccionada entre sangre, suero, plasma y orina.

20 En una realización concreta dicho uso de un anticuerpo monoclonal, un fragmento o variante del mismo anteriormente descrito, se refiere a la detección de la presencia de los serotipos Typhimurium o 4,5,12:i:- de *Salmonella enterica* mediante un ensayo seleccionado entre: ELISA, Western-blot y Dot-blot.

Esta invención proporciona nuevos materiales útiles en la detección y el diagnóstico de dichos microorganismos. El suero monoclonal producido por esta nueva línea celular obtenida ha sido ensayado con éxito frente a un elevado número de cepas de *Salmonella* lo que se desprende de los ejemplos detallados a continuación.

Esta invención proporciona nuevos reactivos biológicos útiles en la detección y el diagnóstico de estas infecciones bacterianas.

### 35 Modo de realización de la invención

A continuación se describen unos ejemplos de realización de la presente invención, con carácter ilustrativo y en modo alguno limitativo del alcance de la misma.

#### 40 Ejemplo 1

*Procedimiento de obtención de un hibridoma secretor de un anticuerpo monoclonal frente al antígeno H:1,2 de Salmonella enterica*

#### 45 1.- Preparación de inmunógeno/antígeno

El procedimiento para el desarrollo de un anticuerpo monoclonal específico objeto de la presente invención, tiene como origen la preparación de inmunógeno, en nuestro caso el antígeno de segunda fase H:1,2. Para ello, una cepa de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (nº: 4.300, Laboratorio de Referencia de *Salmonella*, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid) la cual previamente ha sido serotipificada correctamente, se hizo crecer a 37°C durante 16 horas en un medio específico, gelosa movilidad, que favorece su movilidad en placas Petri. Este serotipo al ser bifásico, puede que no esté expresando el antígeno flagelar que necesitamos, por ello mediante aglutinación con anticuerpos policlonales comerciales se detecta el tipo de antígeno flagelar que se encuentra expresando dicha cepa. En caso necesario se debe provocar el cambio de fase para así poder aislar los antígenos asociados al flagelo en la fase de interés y eliminar los antígenos de la fase no deseada. Para ello, al medio gelosa movilidad se le añade a 50°C el anticuerpo policlonal comercial anti-*Salmonella* H:i-aglutinante, lo que provoca la inmovilización de las bacterias que expresen el antígeno flagelar de primera fase (H:i). Este proceso se repite hasta 3 veces. De esta manera, se conseguirá aislar sólo representantes que estén expresando antígenos flagelares de segunda fase (H:1,2). Una vez conseguido el cambio de fase se recolecta el crecimiento periférico y se le somete a la extracción flagelar mediante tratamiento ácido tal y como describen Ibrahim y cois. (Ibrahim G. F., y cois. Journal of Clinical Microbiology, 22:1040-1044 (1985)). Las preparaciones de antígenos asociados a flagelos obtenidos utilizando este protocolo de extracción son los que se emplearon posteriormente en la inmunización de los ratones.

65 Para las demás técnicas inmunológicas utilizadas en el desarrollo de esta invención (ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), Western-Blot y Dot-Blot) se utilizaron diversos antígenos flagelares de primera y de segunda fase extraídos de distintos serotipos de *Salmonella*. Estos serotipos fueron seleccionados en función de que presentaran antígenos superficiales coincidentes con los de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, es decir antígenos flagelares de segunda fase H:1,2, H:1,5, H:1,6 o H:1,7, antígenos flagelares de primera fase H:i o antígenos somáticos O:1, O:4, O:5

o O:12. En este caso el crecimiento y el cambio de fase cuando era necesario se realizó de la misma manera, pero se varió el modo de obtención, llevando a cabo las extracciones flagelares mediante calor. Éste es un método más rápido, menos laborioso aunque más inespecífico que consiste básicamente en la recolección y disolución del crecimiento periférico en 1 ml de solución salina e incubación a 60°C durante 30 minutos. A continuación se centrifuga durante 5 10 minutos a 10.000 rpm y se recogen 400  $\mu$ l del sobrenadante, en el cual se encuentran los antígenos asociados a flagelos.

La concentración de antígeno flagelar extraído de cada una de las cepas utilizadas en todos los ensayos descritos en este estudio fue determinada preparando las muestras tal y como aconseja el kit Bio-Rad Protein Assay (Bio- 10 Rad) y midiendo las absorbancias de los complejos proteína-colorante a 595 nm en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc.), cuyo programa permite la obtención de la concentración de proteína al extrapolar los valores de absorbancia de las muestras problema con los de un patrón de seroalbúmina bovina.

### 2.- Inmunización de ratones

15 El siguiente paso de la invención consiste en inmunizar ratones con el inmunógeno con el fin de obtener linfocitos B productores de anticuerpos específicos frente al inmunógeno. Para ello se inmunizan ratones hembra Balb/c de 6-7 semanas de edad con la proteína extraída mediante tratamiento ácido (método de Ibrahim y cols. antes citado). La primera inmunización se realiza mediante inyección intraperitoneal con 30  $\mu$ g de proteína en adyuvante completo de Freund en un volumen final de 200  $\mu$ l. Se realizan dos inmunizaciones adicionales a intervalos de 20 días por la misma 20 vía y con la misma cantidad de inmunógeno, esta vez con coadyuvante incompleto de Freund, también en un volumen final de 200  $\mu$ l. Para llevar a cabo el seguimiento del título de anticuerpos de los ratones inmunizados se obtiene una muestra de sangre de la cola del animal y se ensaya mediante Western-Blot frente a diversas extracciones de antígeno flagelar. Así se seleccionan para la fusión los ratones con mayor reactividad. Cuatro semanas después y tres días antes 25 del sacrificio se administra una última dosis intravenosa de antígeno en 200  $\mu$ l de solución salina.

### 3.- Fusión celular

El tercer paso de esta invención consiste en obtener hibridomas procedentes de la fusión de los linfocitos B productores de anticuerpos específicos de la fase anterior con células tumorales a fin de inmortalizar a los mismos. La 30 fusión se realiza según el protocolo de De StGroth y Scheidegger (de StGroth S. F. y Scheidegger D. Journal of Immunological Methods, 35:1-21 (1980)) con pequeñas modificaciones, utilizando para ello la línea SP2/O de mieloma murino crecida en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y una solución de penicilina (100 UI/ml)-estreptomomicina (100  $\mu$ g/ml). El día de la fusión se sacrifica al ratón por dislocación cervical y se le extrae 35 asépticamente el bazo. Se coloca el bazo en una placa Petri con 10 ml de RPMI-PS y se perfunde obteniéndose así los linfocitos necesarios para la fusión. Las células de mieloma en fase exponencial de crecimiento son recogidas por centrifugación de 10 minutos a 1.000 rpm. Ambos tipos celulares se lavan dos veces separadamente con RPMI, se mezclan a razón de 5 linfocitos del bazo por 1 célula de mieloma en RPMI y se mantiene la mezcla a 37°C. Se centrifuga de nuevo y se retira seguidamente el sobrenadante. El sedimento resultante se disocia suavemente añadiendo 40 1 ml de medio de fusión (0,5 gramos PEG 4000, 500  $\mu$ l RPMI, 50  $\mu$ l DMSO) por cada  $1 \times 10^7$  células de mieloma y se hace añadiendo gota a gota el primer mililitro en 30 segundos y el volumen restante de medio de fusión en 1 minuto. Esta mezcla se mantiene un minuto a 37°C sin agitación. Se vuelve a centrifugar la mezcla a 1.200 rpm durante 90 segundos y sin decantar el sobrenadante se mantiene a 37°C durante 90 segundos. La pastilla resultante se disocia suavemente añadiendo gota a gota 6 ml de RPMI sin SBF a 37°C (1 gota cada 3 segundos aprox.), seguidos 45 de otros 9 ml del mismo medio. Se procede a centrifugar de nuevo la mezcla a 1.000 rpm durante 10 minutos y el sedimento resultante se resuspende suavemente en 5 ml de medio selectivo de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Posteriormente se hace un recuento celular en hemocitómetro y se completa el volumen con medio HAT hasta tener una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml y ésta se reparte a razón de 100  $\mu$ l por pocillo en las placas de microtitulación. Como control de la selectividad del medio para los hibridomas y de la inviabilidad de los linfocitos no 50 fusionados, algunos pocillos se reservan a los dos tipos celulares. Las células se incuban en estufa a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad y al cabo de 5 días se añaden 50  $\mu$ l de medio de hipoxantina y timidina (HT) por pocillo.

### 4.- Detección y selección de hibridomas secretores

55 El objetivo de este cuarto punto es la detección y selección de aquellos hibridomas secretores de anticuerpos de interés. Para ello, al cabo de diez días de incubación desde la fusión se recogen los sobrenadantes de los pocillos que presentan crecimiento y se ensayan por ELISA frente al extracto de antígenos flagelares de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium utilizado como inmunógeno. Paralelamente se llevan a cabo ensayos de inmunoreactividad con los sobrenadantes de dichos hibridomas secretores frente a extractos de antígeno flagelar de *Salmonella* transferidos a membranas de PVDF para determinar, mediante inmunodetección, los componentes antigénicos reconocidos.

### 5.- Clonación

65 Los hibridomas seleccionados fueron mantenidos mediante crecimiento clonal. Para ello, las poblaciones de hibridomas clonales productores de los anticuerpos de interés son clonadas y aisladas por cultivo en dilución limitante por dos veces (0,5 células/pocillo) en medio RPMI suplementado con SBF al 15%. Después de 7-10 días de incubación la producción de anticuerpos por los clones individualizados se determina mediante ELISA, seleccionándose los

## ES 2 349 204 A1

mejores productores. La línea celular seleccionada finalmente en esta invención fue la denominada 23D4 que ha sido depositada el 23 de Diciembre de 2005 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con un número de referencia de depósito 05122301 de acuerdo con lo dispuesto en el Tratado de Budapest de 1977 relativo al depósito de células con objetivo de patente.

5

Los hibridomas seleccionados de nuevo se mantienen y se expansionan en cultivo en medio RPMI con Penicilina y Estreptomicina (RPMI/PS) suplementado con SBF al 10%, a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. El líquido sobrenadante del cultivo se utiliza como fuente de anticuerpos para todos los ensayos realizados.

10 Para su conservación durante más tiempo se congelan alícuotas y se almacenan a -70°C o bien en nitrógeno líquido.

### 6.- *Isotipado*

15 Para caracterizar el tipo de anticuerpo monoclonal obtenido se realizó un estudio de su clase o isotipo. Esta clase (isotipo) se determina mediante ELISA inmovilizando dichos anticuerpos monoclonales y utilizando en la segunda incubación conjugados específicos para las inmunoglobulinas A, G y M de ratón unidos a peroxidasa. En este caso el anticuerpo monoclonal seleccionado por su gran especificidad demostró ser de clase o isotipo IgM.

### 7.- *Inmunodetección*

20

Una vez caracterizada la clase o isotipo del anticuerpo monoclonal objeto de esta invención, debe ser estudiada su sensibilidad y su especificidad frente a antígenos asociados a flagelos presentes en el más amplio conjunto de cepas posibles pertenecientes a la especie *Salmonella enterica* y otros microorganismos relacionados. Las técnicas empleadas para este estudio fueron el ensayo de inmunoenzima (ELISA), el Western-Blot y el Dot-Blot y sus resultados se presentan en los ejemplos sucesivos.

25

### Ejemplo 2

30 *Detección de Salmonella enterica ser. Typhimurium y Salmonella enterica ser. 4,5,12:i:- mediante ELISA*

Reseñar en primer lugar que, tanto para la detección de hibridomas productores de anticuerpos como para el estudio de la reactividad del anticuerpo monoclonal seleccionado, este tipo de ensayo se realiza de forma similar.

35

Las pruebas de ELISA se realizan en placas de 96 pocillos fijándose en cada pocillo 100 µl de una suspensión de extracto de antígenos asociados a flagelos de distintos serotipos de *Salmonella* a una concentración de 0,5 µg de proteína/ml en tampón carbonato-bicarbonato. Cada antígeno fue testado en cada placa por triplicado. Dichos antígenos son adsorbidos sobre las placas de ELISA durante 16 horas a 4°C ó 1 hora a 37°C. Transcurrido ese tiempo se elimina el tampón y se procede al bloqueo de las placas con 200 µl/pocillo de PBS-BSA 1% durante 1 hora a 37°C. A continuación, se retira la solución de bloqueo y se depositan en cada pocillo 100 µl de una dilución 1:100 en PBSBT (PBS + BSA 1% + Tween 20 0,05%) del anticuerpo monoclonal seleccionado y se incuba durante 1 hora a 37°C (en el caso de que se estén estudiando hibridomas productores el sobrenadante del cultivo celular se utiliza sin diluir). Tras tres lavados con PBSBT, se realiza una nueva incubación con 100 µl por pocillo de una dilución 1:2.000 en PBSBT de anticuerpos anti-inmunoglobulinas totales o anti-IgM de ratón conjugados con peroxidasa. Finalizada la incubación y tras lavar nuevamente las placas tres veces con PBSBT éstas se incuban con 100 µl de la solución de revelado OPD (Orto-Phenilén Diamina) durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. La reacción se para con 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M, y se mide la absorbancia a 490 nm en un lector automático de placas de ELISA. Con las lecturas obtenidas se calcularon los porcentajes de positividad (PP) de las muestras y de los controles positivo y negativo con la siguiente fórmula:  $PP = \text{Densidad óptica de la muestra testada} \times 100 / \text{Densidad óptica del control positivo}$ . Las muestras se clasifican como positivas si su porcentaje de positividad es superior al 40% del control positivo.

50

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

55

### Ejemplo 3

60 *Detección de Salmonella enterica ser. Typhimurium y Salmonella enterica ser. 4,5,12:i:- mediante la técnica de Western-Blot*

60

La separación de los distintos antígenos flagelares se realiza mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), los extractos antigénicos son disueltos en tampón de tratamiento y tratados a 100°C durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo. Las concentraciones de acrilamida utilizadas son del 4% en el gel de apilamiento y del 12,5% en el gel de separación. Las mezclas para el gel de apilamiento y para el gel de separación son desgasificadas y posteriormente se les añaden los catalizadores de polimerización persulfato amónico y TEMED. La separación electroforética se lleva a cabo en una cámara de electroforesis MiniProtean II (BIO-RAD). En cada pocillo se aplican 15 µl de extracto antigénico conteniendo una cantidad de proteína total de 2,5 µg. En cada gel se reserva una calle para un marcador de peso molecular preteñido (BIO-RAD)

65

## ES 2 349 204 A1

que está conformado por: fosforilasa B (113 kDa), seroalbúmina bovina (92 kDa), ovoalbúmina (52,3 kDa), anhidrasa carbónica (35,3 kDa), inhibidor de tripsina de soja (28,7 kDa) y lisozima (21,3 kDa).

5 La separación electroforática se realiza a un voltaje constante de 200 V durante 45 minutos aproximadamente, o hasta que el frente de migración marcado por el azul de bromofenol llegue a 2-3 mm del borde inferior del gel. Todos los geles se realizan por duplicado. Uno de ellos se tiñe con azul de Coomassie para estimar el peso molecular de los antígenos extraídos. Para su tinción el gel se mantiene 1 hora en la solución de Coomassie Brilliant Blue R al 0,12% en metanol al 50% y ácido acético al 10%. Posteriormente para eliminar el exceso de solución colorante se destiñen los geles con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%. Esta solución se sustituye por una de metanol al 10 5% y ácido acético al 7% que permite la rehidratación y conservación de los geles.

Una vez finalizada la electroforesis, los distintos antígenos asociados a flagelos separados en el otro gel preparado se transfieren a una membrana de PVDF previamente hidratada para llevar a cabo la inmunodetección. La transferencia se realiza en un aparato de electrotransferencia semiseca comercial (Fast Blot System B-33, Biometra) durante 1 hora 15 a una intensidad de 5 mA/cm<sup>2</sup>. La membrana de PVDF con los antígenos asociados a flagelos unidos se bloquea durante 1 hora a 37°C o a 4°C durante toda la noche con TBS-leche al 8%. Una vez bloqueada la membrana, se realiza la incubación de la misma durante 1 hora a 37°C y con agitación suave con una dilución 1:50 del anticuerpo monoclonal en TBS-leche al 8%. Una vez finalizada la incubación primaria se procede a realizar tres lavados de 5 minutos con TBS. Tras los lavados se realiza una segunda incubación de 1 hora a 37°C y con agitación suave con anti-20 inmunoglobulinas totales o anti-IgM de ratón conjugados con peroxidasa y diluidos 1/2.000 en TBS-leche al 8%. Tras la incubación con el anticuerpo secundario se realizan tres lavados de 5 minutos cada uno en TBS. La membrana de PVDF se incuba entonces en oscuridad con la solución de revelado hasta la visualización de las bandas, y máximo de 30 minutos, procediéndose a la parada de la reacción mediante el lavado con agua destilada.

25 Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

### Ejemplo 4

30 *Detección de Salmonella enterica ser. Typhimurium y Salmonella enterica ser. 4,5,12:i:- mediante la técnica de Dot-Blot*

En primer lugar se diluyen los distintos extractos antigénicos asociados a flagelos con solución salina a una concentración final de 25 ng/μl. A continuación se aplican 2 μl de cada una de las muestras en una membrana de nitrocelulosa 35 y se dejan secar a temperatura ambiente. La membrana de nitrocelulosa con los antígenos unidos se bloquea durante 1 hora a 37°C con TBS-leche al 8%. Una vez bloqueada la membrana se procede a realizar tres lavados de 5 minutos con TBS. A continuación, se realiza la incubación de la membrana durante 1 hora a 37°C y con agitación suave con una dilución 1:50 del anticuerpo monoclonal en TBS-leche al 8%. Una vez finalizada la incubación primaria se procede a realizar tres lavados de 5 minutos con TBS. Tras los lavados se realiza una segunda incubación de 1 hora a 37°C 40 y con agitación suave con anti-inmunoglobulinas totales o anti-IgM de ratón conjugados con peroxidasa y diluidos 1/2.000 en TBS-leche al 8%. Tras la incubación con el anticuerpo secundario se realizan tres lavados de 5 minutos cada uno en TBS. La membrana de nitrocelulosa se incuba entonces en oscuridad con la solución de revelado hasta la visualización de las bandas, y máximo de 30 minutos, procediéndose a la parada de la reacción mediante el lavado con agua destilada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

45

50

55

60

65



REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la obtención de un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- a) inmunizar un animal con el antígeno flagelar H:1,2 aislado;
  - 10 b) immortalizar los linfocitos B procedentes de los ratones inmunizados en el paso anterior, mediante su fusión con células de mieloma para dar lugar a un hibridoma;
  - c) aislamiento de aquellos clones de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales reactivos frente al antígeno flagelar H:1,2;
  - 15 d) cultivo de dichos clones celulares y posterior obtención del anticuerpo monoclonal de interés, fragmento o variante del mismo,
- caracterizado** porque dicho anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo reacciona específicamente frente al antígeno flagelar H:1,2 presente en *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y de forma cruzada con el serotipo 4,5,12:i:-.
- 20
2. Un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1 **caracterizado** porque reacciona específicamente frente al antígeno flagelar H:1,2 presente en *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y de forma cruzada con el serotipo 4,5,12:i:-.
- 25
3. Un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el animal inmunizado para su obtención está seleccionado entre: conejo, cabra y ratón.
- 30
4. Un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo según la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicho anticuerpo posee un isotipo seleccionado entre: IgG, e IgM.
- 35
5. Un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo según una de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizado** porque el hibridoma aislado en el paso c) de su procedimiento de obtención es la línea celular 23D4, ECACC no. 05122301.
- 40
6. Un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo según la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicho anticuerpo es murino.
- 45
7. Un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo según una de las reivindicaciones 5 o 6, **caracterizado** porque dicho anticuerpo es del isotipo IgM.
- 50
8. Un anticuerpo monoclonal, fragmento o variante del mismo según una de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado** porque dicho anticuerpo monoclonal se encuentra en sobrenadante, ascites o purificado.
- 55
9. Un fragmento de un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 **caracterizado** porque está seleccionado entre: un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> y un fragmento Fv.
- 60
10. Una línea celular capaz de producir un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente frente al antígeno H:1,2 presente en el serotipo Typhimurium y de forma cruzada con el serotipo 4,5,12:i:- de *Salmonella enterica* definido en las reivindicaciones 2 a 8 **caracterizada** porque dicha línea celular es la línea 23D4, ECACC no. 05122301.
- 65
11. Uso de un anticuerpo, fragmento o variante del mismo según una de las reivindicaciones 2 a 9, para detectar la presencia de los serotipos Typhimurium o 4,5,12:i:- de *Salmonella enterica* en una muestra.
12. Uso de un anticuerpo, fragmento o variante del mismo según la reivindicación 11, **caracterizado** porque dicha muestra está seleccionada entre una muestra alimentaria y una muestra clínica.
13. Uso de un anticuerpo, fragmento o variante del mismo según una de las reivindicaciones 11 u 12, **caracterizado** porque dicha muestra clínica está seleccionada entre sangre, suero, plasma y orina.
14. Uso de un anticuerpo monoclonal, un fragmento o variante del mismo según una de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizado** porque dicha detección se realiza mediante un ensayo seleccionado entre: ELISA, Western-blot y Dot-blot.

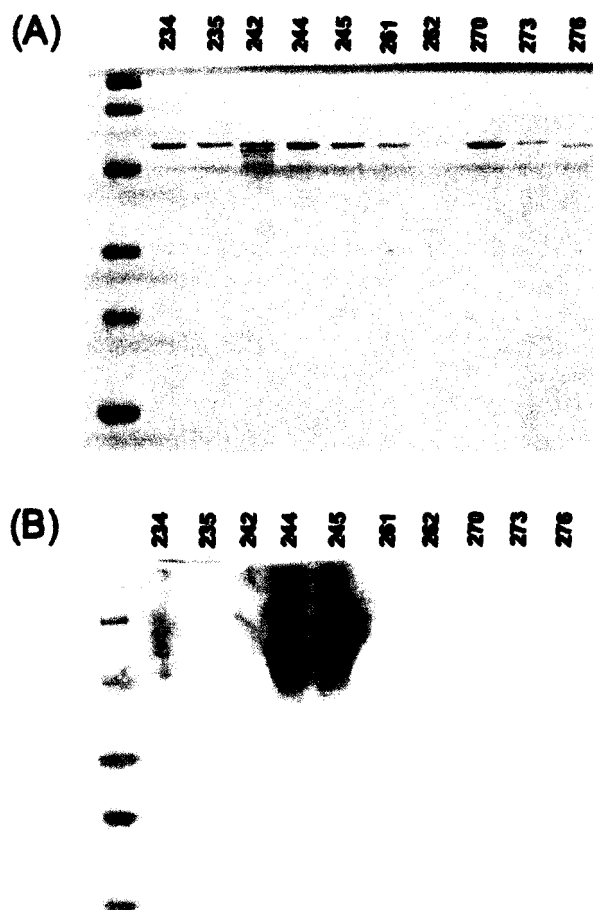


FIGURA 1

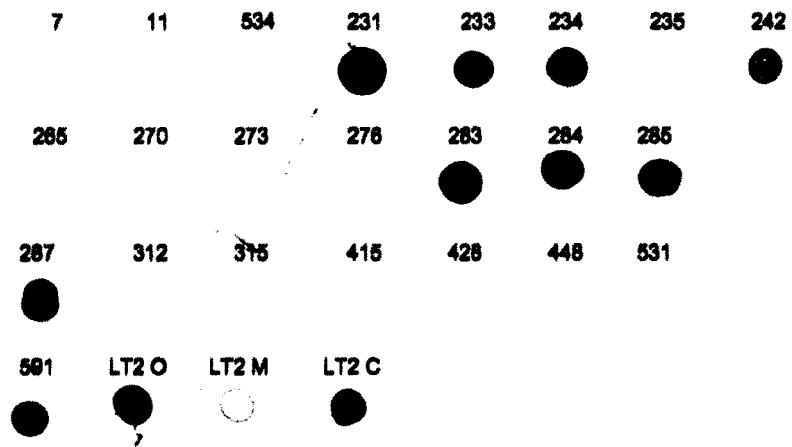


FIGURA 2



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200700625

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.03.2007

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	VIRES N., et al. "Production of monoclonal antibodies specific for the i and 1,2 flagellar antigens of <i>Salmonella</i> typhimurium and characterization of their respective epitopes." Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64, No. 12 (1998) pages 5033-5038. Páginas 5033-5034.	1-14
A	GARAIZAR J. et al. "DNA micorarray-based typing of an atypical monophasic <i>Salmonella enterica</i> serovar." Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40, No. 6 (2002), p. 2074-2078. Páginas 2074 y 2077.	1-14
A	GARAIZAR J., REMENTERIA A. AND PORWOLLIK A. "DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens?" Federation of European Microbiological Societies. Vol. 47 (2006), p. 178-189. Páginas 178 y 181-182.	1-14
A	ECHEITA M. A., ALADUEÑA A., CRUCHAGA S., USERA M.A. "Emergence and spread of an atypical <i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serotype 4,5,12:i- strain in Spain." Journal of Clinical Microbiology. Vol. 37, No. 10 (1999), p. 3425. Página 3425.	1-14

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.12.2010

Examinador

M. García Bueno

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200700625

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.03.2007

③② Fecha de prioridad: **00-00-0000**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GÜERRI M. L., ALADUEÑA A., ECHEITA A., ROTGER R. "Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate." International Journal of Antimicrobial Agents. Vol.24 (2004) p. 327-333. Páginas 327, 330-332.	1-14
A	ECHEITA M. A., HERRERA S., USERA M. A. "Atypical, fljB-negative <i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium." Journal of Clinical Microbiology. Vol. 39, No. 8 (2001) p. 2981-2983. Todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
01.12.2010

Examinador  
M. García Bueno

Página  
2/6

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/20** (2006.01)  
**C07K16/12** (2006.01)  
**C07K16/28** (2006.01)  
**C12N5/12** (2006.01)  
**G01N33/02** (2006.01)  
**G01N33/569** (2006.01)  
**C12Q1/68** (2006.01)  
**C12R1/42** (2006.01)  
**C12R1/91** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K, G01N, C12Q, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.12.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	VIRES N., et al. "Production of monoclonal antibodies specific for the i and 1,2 flagellar antigens of <i>Salmonella typhimurium</i> and characterization of their respective epitopes." <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . Vol. 64, No. 12 (1998) pages 5033-5038.	1998
D02	GARAIZAR J. et al. "DNA micorarray-based typing of an atypical monophasic <i>Salmonella enterica</i> serovar." <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . Vol. 40, No. 6 (2002), p. 2074-2078.	2002
D03	GARAIZAR J., REMENTERIA A. AND PORWOLLIK A. "DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens?" <i>Federation of European Microbiological Societes</i> . Vol. 47 (2006), p. 178-189.	2006
D04	ECHAITA M. A., ALADUEÑA A., CRUCHAGA S., USERA M.A. "Emergence and spread of an atypical <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype 4,5,12:i- strain in Spain." <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . Vol. 37, No. 10 (1999), p. 3425.	1999
D05	GÜERRI M. L., ALADUEÑA A., ECHAITA A., ROTGER R. "Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate." <i>Internationa Journal of Antimicrobial Agents</i> . Vol.24 (2004) p. 327-333.	2004
D06	ECHAITA M. A., HERRERA S., USERA M. A. "Atypical, fljB-negative <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain of serovar 4,5,12:i- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium." <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . Vol. 39, No. 8 (2001) p. 2981-2983.	2001

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento para la obtención de un anticuerpo monoclonal que reacciona frente al antígeno flagelar H:1,2 presente en *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y, de forma cruzada con el serotipo 4,5,12:i- (reivindicaciones 1-3), dicho anticuerpo o su fragmento de él (reivindicaciones 4-9), una línea celular capaz de producir dicho anticuerpo (reivindicación 10), y el uso del anticuerpo para detectar la presencia de serotipos Typhimurium o 4,5,12:i- de *Salmonella entérica* en una muestra alimentaria o clínica mediante un ensayo inmunológico (reivindicación 11-14).

El documento D01 se considera el más próximo al estado de la técnica y divulga la producción de anticuerpos monoclonales para ambas flagelinas de *S. Typhimurium*, específicos para los antígenos H:i y H:1,2, secretados por clones de hibridomas obtenidos de ratones inmunizados con flagelina purificada. Estos péptidos parecen ser antígenos muy propicios en un ELISA para detectar anticuerpos específicos de *S. typhimurium* (ver páginas 5033-5034).

El documento D02 divulga que el serotipo atípico [4,5,12:i-] de *Salmonella entérica* contiene casi todos los genes presentes en el serotipo Typhimurium. Ésta y otras observaciones corroboran la hipótesis de que este serotipo atípico es una variante del serotipo Typhimurium.

La tipificación de las cepas en las matrices puede contribuir a la comprensión de la epidemiología y patología de las cepas bacterianas, ya que permite clasificar los genomas de forma independiente de la tipificación de un pequeño conjunto de antígenos de superficie o fago (ver páginas 2074 y 2077).

El documento D03 divulga una investigación de tres cepas de *Salmonella entérica* ser. 4,5,12:i- que revelaron deleciones genéticas en la vía del glioxilato y del gen flagelar de segunda fase (ver páginas 178 y 181-182).



El documento D04 divulga que el serotipo 4,5,12:i:- de *Salmonella entérica*, resistente a gentamicina ha surgido y se ha extendido a los seres humanos en España, probablemente con carne de cerdo contaminada como fuente (ver página 3425).

El documento D05 divulga la clasificación del serotipo atípico 4,5,12:i:- de *Salmonella entérica* como una variante monofásica de *S. Typhimurium* tipo de fago U302, ya que las cepas fueron agrupadas por PFGE y análisis de plásmidos con las cepas de *S. Typhimurium* U302 resistentes a la ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, gentamicina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprima-sulfametoxazol. Este es el fenotipo de resistencia más frecuente en las cepas 4,5,12:i:- aisladas en España (ver páginas 327, 330-332).

El documento D06 divulga que el serotipo 4,5,12:i:- de *Salmonella entérica*, resistente a la ampicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, gentamicina, estreptomina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, podría ser considerado una *Salmonella* serovar *Typhimurium*, variante monofásica 5+ (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (art. 6 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (art. 8 Ley 11/1986).

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos D01-D06 en que ninguno de los documentos citados muestra anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente frente al antígeno flagelar H:1,2 presente en *Salmonella entérica* serotipo *Typhimurium* y de forma cruzada con el serotipo 4,5,12:i:-.

Por lo tanto, los documentos D01-D06 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia, las reivindicaciones 1-14 son nuevas y se considera que implican actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.