

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 625**

51 Int. Cl.:
A61K 39/02 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **97917185 .7**
96 Fecha de presentación: **23.04.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0904288**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.1999**

54 Título: **Vacuna que comprende la proteína EspA asociada a Escherichia coli patógena**

30 Prioridad:
23.04.1996 US 15999 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2012

73 Titular/es:
**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
(100.0%)
103 - 6190 Agronomy Road Vancouver
British Columbia V6T 1Z4 , CA**

72 Inventor/es:
**FINLAY, B. BRETT;
STEIN, MARKUS;
KENNY, BRENDAN;
DONNENBERG, MICHAEL. S. y
LAI, LI-CHING**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 389 625 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

Vacuna que comprende la proteína EspA asociada a *Escherichia coli* patógena.

Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense 60/015.999, presentada el 23 de abril de 1996.

Declaración en cuanto a investigación de patrocinio federal

Esta invención se realizó con el respaldo del premio al Servicio a la Salud Pública AI32074 de los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos en esta invención.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a una composición de vacuna según se define en las reivindicaciones y al uso de un polipéptido según se define en las reivindicaciones para la preparación de una vacuna para mejorar una enfermedad causada por un organismo productor de EspA.

Antecedentes de la invención

15 Se han usado los antibióticos durante años para tratar con éxito diversas infecciones bacterianas. Sin embargo, la resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido un problema creciente a lo largo de los últimos años. Muchos patógenos son ahora resistentes a varios antibióticos, y en algunos casos, las enfermedades que causan ya no pueden tratarse con antibióticos convencionales. A pesar de los éxitos pasados de los antibióticos, ha habido pocas, si alguna, nuevas clases de antibióticos desarrolladas en las últimas dos décadas. Se han introducido nuevas variaciones en fármacos existentes, pero habitualmente surge resistencia a estos compuestos en el plazo de un corto periodo de tiempo.

20 Muchos estudios han mostrado que si se realiza una mutación en un gen que codifica para un factor de virulencia, el organismo que contiene ese gen ya no es patógeno. Adicionalmente, si se vacuna un huésped contra un factor de virulencia, a menudo puede bloquearse la enfermedad. Sin embargo, no se ha mostrado que la inhibición específica de un factor de virulencia pueda atenuar la enfermedad.

25 Se han estudiado los mecanismos de acción para toxinas, adherencia, invasión, parasitismo intracelular. Sin embargo, cada factor de virulencia usa un mecanismo diferente, lo que ha hecho imposible el desarrollo de un inhibidor de amplio espectro. Un factor conservado que podría considerarse una diana para un agente terapéutico es un sistema regulador de dos componentes. Sin embargo, este sistema no es específico para factores de virulencia, y se usa en varios sistemas de mantenimiento bacterianos. Adicionalmente, los sistemas se han identificado en sistemas eucariotas, lo que aumentaría el riesgo de toxicidad para el huésped si se utilizase un inhibidor. Para desarrollar un agente antiinfeccioso ideal, el mecanismo de virulencia bacteriano al que afecta el antibiótico debe ser universal para muchos patógenos, específicos para mecanismos de virulencia, y no estar presente en células huésped. Un sistema de este tipo que se ha identificado recientemente es el sistema de secreción bacteriana de tipo III.

35 Las bacterias Gram-negativas utilizan una maquinaria especializada para exportar moléculas a través de sus dos membranas y el piroplasma, un proceso crítico para mover factores de virulencia hasta la superficie bacteriana en la que pueden interaccionar con componentes del huésped. La secreción de bacterias Gram-negativas se ha dividido en cuatro rutas principales. En primer lugar, la secreción de tipo I se usa por una pequeña familia de toxinas, siendo la hemolisina de *E. coli* el prototipo. En segundo lugar, el sistema de secreción de tipo II es la principal ruta de exportación usada por la mayoría de bacterias Gram-negativas para exportar muchas moléculas, incluyendo algunos factores de virulencia; comparte homología con mecanismos de resistencia a fármacos de mamíferos. En tercer lugar, el sistema de secreción de tipo IV está codificado dentro del producto secretado, que se escinde a sí mismo como parte del mecanismo de secreción; el prototipo de este sistema es la proteasa de IgA de *Neisseria*. En cuarto lugar, la ruta de secreción descubierta más recientemente es la ruta de tipo III.

45 Los sistemas de secreción de tipo III se describieron originariamente como un sistema de secreción para proteínas de virulencia secretadas por *Yersinia*, YOP, que son críticas para la virulencia de *Yersinia*. Entonces se identificó un sistema de secreción homólogo en varios patógenos de plantas, incluyendo *Pseudomonas syringae*, *P. solanacearum* y *Xanthomonas campestris*. Estos patógenos de plantas usan esta ruta de secreción para secretar factores de virulencia (horquillas y otros) que se requieren para causar la enfermedad en plantas. Aunque el sistema de secreción es similar, las horquillas y YOP (es decir, los factores de virulencia secretados) no son polipéptidos homólogos. Otros varios sistemas de secreción de tipo III necesarios para la virulencia se han identificado más recientemente en otros patógenos. Estos sistemas incluyen los sistemas invasivos que utilizan *Salmonella* y *Shigella* para entrar en las células y causar la enfermedad. Se ha identificado otro sistema de secreción de tipo III en *Salmonella* que es crítico para la enfermedad, aunque los productos secretados de esta ruta y los mecanismos de virulencia no se han establecido aún. *Pseudomonas aeruginosa* tiene un sistema de secreción de tipo III necesario

para la secreción de exoenzima S, un potente factor de virulencia.

La *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC, *enteropathogenic Escherichia coli*) es una causa principal de diarrea infantil y fue la primera *E. coli* que se mostró que causaba gastroenteritis. La *E. coli* enteropatógena activa rutas de transducción de señales de las células huésped epiteliales y provoca una redistribución citoesquelética, junto con formación de lesiones de fijación/destrucción y de pedestal.

Un modelo de tres fases ha descrito la patogenia de *E. coli* enteropatógena. Una adherencia localizada inicial a células epiteliales, mediada por una fimbria de tipo IV, está seguida por la activación de rutas de transducción de señales de células huésped epiteliales y fijación y destrucción íntimas. Las proteínas implicadas en la fijación y destrucción se han descrito en el documento CA 2 078 716 A1 y la base de datos Genbank, versión de registro GI: 1018995. La secreción de proteínas por *E. coli* enteropatógena es esencial para transducir señales a células epiteliales (véase Kenny y Finlay. PNAS 92 (1995), 7991-7995). La transducción de señales en las células huésped epiteliales implica la activación de actividad tirosina cinasa de células huésped que conduce a la fosforilación de tirosinas de una proteína de membrana del huésped de 90 kilodalton, Hp9,0, y flujos de inositol fosfato (IP₃) y calcio intracelulares. Tras esta transducción de señales, las bacterias se adhieren de forma íntima a la superficie de la célula epitelial, acompañado por daño a las microvellosidades de las células huésped epiteliales y la acumulación de proteínas citoesqueléticas bajo las bacterias.

Sumario de la invención

La presente divulgación se basa en el descubrimiento de una proteína asociada con la virulencia en bacterias patógenas, por ejemplo *E. coli* enteropatógena.

El análisis de secuencia de ADN del locus de destrucción de enterocitos entre *eaeA* y *espB* identificó un gen (*espA*) que correspondía con la secuencia amino-terminal de la proteína secretada por *E. coli* enteropatógena de 25 kilodalton. Un mutante con una inserción en *espA* no secreta esta proteína, no activa la transducción de señales de las células epiteliales ni provoca una redistribución citoesquelética. Sin embargo, estas funciones pueden complementarse por un gen *espA* de tipo natural clonado.

Se clonaron y secuenciaron dos genes de *E. coli* enteropatógena, *espA* y *espB*, que codifican para factores de virulencia secretados, EspA y EspB respectivamente. Se mostró que estas proteínas estaban implicadas en la activación de rutas de transducción de señales epiteliales del huésped y la invasión. Dado que EspA es una proteína secretada, es idealmente adecuada para su uso en una proteína de fusión unida a un polipéptido de interés.

[1] Una composición de vacuna que comprende

(i) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la figura 1; o

(ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la figura 1.

[2] La composición de vacuna de [1] que es para mejorar una enfermedad causada por un organismo productor de EspA.

[3] La composición de vacuna de [1] o [2], que es para inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a un organismo productor de EspA.

[4] Uso de

(i) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la figura 1; o

(ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la figura 1;

para la preparación de una vacuna para mejorar una enfermedad causada por un organismo productor de EspA.

[5] La composición de vacuna de [2] o [3] o el uso de [4], en la/el que el organismo productor de EspA es *E. coli*.

[6] La composición de vacuna o el uso de [5], en la/el que la *E. coli* productora de EspA es *E. coli* enteropatógena.

[7] La composición de vacuna o el uso de [5], en la/el que la *E. coli* productora de EspA es *E. coli* enterohemorrágica.

La ruta de secreción de tipo III es una diana ideal para posibles inhibidores, porque es una ruta conservada específica de factor de virulencia identificada en bacterias. La presente divulgación proporciona un método para identificar inhibidores de los sistemas de secreción de tipo III. La relevancia de esta divulgación se refiere al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos antibacterianos. Al contrario que otros antibióticos, los compuestos identificados por el método descrito en el presente documento no destruirán o inhibirán el crecimiento de patógenos;

en vez de eso, los compuestos bloquearán la secreción de factores de virulencia que son críticos para provocar la enfermedad. Dado que el sistema de secreción de tipo III es el primer mecanismo de virulencia que muestra un gran grado de conservación entre diversos patógenos, algunos de los compuestos identificados por el método de esta invención serán agentes terapéuticos de amplio espectro. El beneficio será la identificación de nuevos agentes terapéuticos que pueden usarse en el tratamiento de varias enfermedades de seres humanos, animales y plantas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducida de *espA* (denominadas en el presente documento SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente). Los posibles sitios de unión a ribosoma están subrayados. Los nucleótidos incluidos en los cebadores Donne-99 y Donne-100, que flanquean la delección diseñada por ingeniería en pLCL121, están incluidos en recuadros.

La figura 2 muestra la construcción de una mutación no polar en *espA*. Los cebadores Donne-90 y el cebador inverso se usaron para amplificar un fragmento que contenía una parte en 5' del gen, que se clonó en pCRscript para crear pLCL119. Los cebadores Donne-100 y el cebador universal se usaron para amplificar un fragmento que contenía una parte en 3' del gen, que se clonó en pCRscript para crear pLCL120. Se incorporaron nuevos sitios de *NruI* tanto en Donne-99 como en Donne-100 de modo que pudo clonarse el fragmento de *NruI*-*Sall* de pLCL120 en pLCL119 para crear pLCL121, que tiene una delección de 150 pb dentro del gen *espA*. Se clonó un fragmento de *SmaI* de pUC18K que contenía el gen de resistencia a kanamicina *aphA-3* en el sitio de *NruI* de pLCL121 para crear pLCL122. Esta inserción da como resultado una fusión de transcripción del gen *aphA-3* y una fusión de traducción del extremo 3' del gen *espA*, con conservación del marco de lectura de *espA*. Los sitios de unión a ribosoma están subrayados.

La figura 3 muestra un mapa genético de los plásmidos que contienen los genes *espA*, *espD* y *espB* de RDEC-1 (A) y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (B). Las flechas indican las posiciones en las que se realizaron inserciones de codón de terminación en *espA* y *espB* (A), y la mutación del marco de lectura diseñada por ingeniería en el sitio de *BglII* en *espD* (B). La delección de 250 pares de bases en *espB* se marca por // . Los recuadros negros y blancos muestran marcos de lectura abiertos y marcos de lectura abiertos pronosticados. Las enzimas de restricción se indican de la siguiente manera: Bam, BamHI; Ec, EcoRI; Bg, BglII; Xb, XbaI; Sa, Sall.

La figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de *espA* de RDEC-1 (A) (denominadas en el presente documento SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente) y *espB* (B) (denominadas en el presente documento SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente). Los asteriscos indican codones de terminación. Los posibles sitios de unión a ribosoma están subrayados. Las secuencias de aminoácidos pronosticadas de EspA y EspE están alineadas en C) (SEQ ID NO: 7-14). Las zonas sombreadas representan identidad. Se han depositado secuencias de nucleótidos y de aminoácidos en el EMBL GenBank y sus números de registro son los siguientes: *espA* de RDEC-1 (U80908), *espB* de RDEC-1 (U80796), *espA* de la cepa E2348/59 de *Escherichia coli* enteropatógena (Z54352), *espB* de la cepa E2348/69 de *Escherichia coli* enteropatógena (Z21555), *espD* de la cepa E2348/69 de *Escherichia coli* enteropatógena (Y09228), *espB* de serotipo O157 de la cepa EDL933 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (X96953), *espB* de serotipo O26 de la cepa 413/89-1 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (X99670).

Descripción detallada

Se describe un polipéptido, denominado EspA, que se secreta por *E. coli* patógena, tal como la *E. coli* enteropatógena (EPEC) y enterohemorrágica (EHEC). El diagnóstico de la enfermedad causada por tal *E. coli* patógena puede realizarse mediante técnicas convencionales, tales como las basadas en el uso de anticuerpos que se unen a EspA para detectar la proteína, así como las basadas en el uso de sondas de ácido nucleico para la detección de ácidos nucleicos que codifican para el polipéptido EspA. También se describen secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican para polipéptido EspA, péptidos EspA, un método recombinante para producir EspA recombinante, anticuerpos que se unen a EspA, y un kit para la detección de *E. coli* productora de EspA. La invención proporciona una composición de vacuna tal como se define en las reivindicaciones para inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a un organismo productor de EspA.

Los detalles de las realizaciones preferidas de la presente invención se exponen en los dibujos adjuntos y la siguiente descripción.

Tal como se usa en el presente documento, el término "EspA" (para proteína A secretada [o de señalización] por EPEC) se refiere a un polipéptido que es una proteína secretada a partir de *E. coli* enteropatógena o enterohemorrágica y tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kilodalton según se determina mediante SDS-PAGE. EspA es una proteína secretada por *E. coli* enteropatógena necesaria para activar la transducción de señales de las células epiteliales, contacto íntimo, y formación de lesiones de fijación y destrucción, procesos correlacionados con la enfermedad. Un ejemplo de células epiteliales son células.

Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" abarca cualquier variante alélica que se produce de manera natural del mismo así como formas recombinantes fabricadas. Tal como se usa en el presente documento, polipéptidos EspA abarcan formas tanto que se producen de manera natural como recombinantes, es decir, formas que no se producen de manera natural de la proteína y el péptido que son suficientemente idénticas al

péptido EspA que se produce de manera natural como para tener una función similar de provocar patogenicidad. Ejemplos de tales polipéptidos incluyen los polipéptidos EspA de *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica, pero no se limitan a los mismos. La proteína y los polipéptidos incluyen derivados, análogos y compuestos peptidomiméticos. Alternativamente, los péptidos EspA pueden sintetizarse químicamente usando procedimientos de síntesis conocidos por un experto en la técnica. Preferiblemente, se usa un sintetizador de péptidos automatizado con aminoácidos N^oFmoc en una resina de injerto de polietilenglicol-poliestireno (PEGPS). Pueden usarse ligadores adecuados tales como un ligador de amida peptídico (PAL), por ejemplo, para crear grupos terminales carboxamida.

El término “sustancialmente puro” se usa en el presente documento para describir una molécula, tal como un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido EspA, o un fragmento del mismo) que está sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos y otros materiales biológicos con los que está asociado de manera natural. Por ejemplo, una molécula sustancialmente pura, tal como un polipéptido, puede ser al menos el 60%, en peso seco, la molécula de interés. Un experto en la técnica puede purificar polipéptidos EspA usando métodos de purificación de proteínas convencionales y la pureza de los polipéptidos puede determinarse usando métodos convencionales incluyendo, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS-PAGE), cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC)), y análisis de secuencia de aminoácidos amino-terminal.

Los polipéptidos EspA dados a conocer en el presente documento pueden tener una de las secuencias de aminoácidos de EspA de *E. coli* enteropatógena humana o de conejo, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la figura 1 o la figura 4. Los polipéptidos EspA, tales como los mostrados en las figuras 1 y 4, pueden caracterizarse por tener aproximadamente 25 kD según se determina mediante SDS-PAGE.

También se dan a conocer polipéptidos que tienen secuencias que son “sustancialmente idénticas” a la secuencia de un polipéptido EspA, tal como uno de los EspA en las figuras 1 y 4. Una secuencia de aminoácidos “sustancialmente idéntica” es una secuencia que se diferencia de una secuencia de referencia tan sólo por sustituciones de aminoácidos conservativas, por ejemplo, sustituciones de un aminoácido por otro de la misma clase (por ejemplo, sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina), o por una o más sustituciones, deleciones o inserciones no conservativas, siempre que el polipéptido conserve al menos una actividad específica de EspA o un epítipo específico de EspA. Por ejemplo, pueden deleccionarse uno o más aminoácidos de un polipéptido EspA, dando como resultado la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar significativamente su actividad biológica. Por ejemplo, pueden eliminarse aminoácidos amino o carboxilo terminales que no se requieren para la actividad biológica EspA. Tales modificaciones pueden dar como resultado el desarrollo de polipéptidos EspA activos más pequeños.

Otros polipéptidos EspA dados a conocer en el presente documento son polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que son idénticas en al menos el 50% a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido EspA, tal como cualquiera de los EspA en las figuras 1 y 4. La longitud de comparación para determinar la homología de secuencias de aminoácidos puede ser, por ejemplo, de al menos 15 aminoácidos, por ejemplo, de al menos 20, 25 ó 35 aminoácidos. La homología puede medirse usando software de análisis de secuencias convencional (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705; véase también Ausubel, *et al.*, citado anteriormente).

También se describen fragmentos de polipéptidos EspA que conservan al menos un epítipo o actividad específica de EspA. Por ejemplo, puede usarse un fragmento de polipéptido EspA que contiene, por ejemplo, al menos 8-10 aminoácidos, como inmunógeno en la producción de anticuerpos específicos para EspA. El fragmento puede contener, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que se conserva en EspA. Además de su uso como inmunógenos peptídicos, los fragmentos de EspA descritos anteriormente pueden usarse en inmunoensayos, tales como ELISA, para detectar la presencia de anticuerpos específicos para EspA en muestras.

Los polipéptidos EspA pueden obtenerse usando cualquiera de varios métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse polipéptidos EspA en un sistema de expresión recombinante convencional (véase a continuación), sintetizarse químicamente (este enfoque puede estar limitado a pequeños fragmentos de péptidos EspA), o purificarse a partir de tejidos en los que se expresan de manera natural (véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, citado anteriormente).

También se describen moléculas de ácido nucleico aislado que codifican para los polipéptidos EspA descritos anteriormente, así como fragmentos de los mismos. Por ejemplo, se dan a conocer ácidos nucleicos que codifican para EspA en las figuras 1 y 4. Estos ácidos nucleicos pueden contener secuencias de nucleótidos que se producen de manera natural (véanse las figuras 1 y 4), o secuencias que difieren de las de los ácidos nucleicos que se producen de manera natural que codifican para EspA, aunque codifican para los mismos aminoácidos, debido a la degeneración del código genético. Los ácidos nucleicos pueden contener nucleótidos de ADN o ARN, o combinaciones o modificaciones de los mismos.

Por “ácido nucleico aislado” se entiende un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN, que no es inmediatamente contiguo a las secuencias flanqueantes en 5' y 3' a las que normalmente es inmediatamente

contiguo cuando está presente en el genoma que se produce de manera natural del organismo del que se deriva. Por tanto, el término describe, por ejemplo, un ácido nucleico que se incorpora en un vector, tal como un plásmido o vector viral, un ácido nucleico que se incorpora en el genoma de una célula heteróloga (o el genoma de una célula homóloga, pero en un sitio diferente de aquél en el que se produce de manera natural); y un ácido nucleico que existe como molécula independiente, por ejemplo, un fragmento de ADN producido mediante amplificación por PCR o digestión con enzimas de restricción, o una molécula de ARN producida mediante transcripción *in vitro*. El término también describe un ácido nucleico recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica para secuencias de polipéptidos adicionales que puede usarse, por ejemplo, en la producción de una proteína de fusión.

Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse como moldes en métodos convencionales para la producción de productos génicos de EspA (por ejemplo, ARN de EspA y polipéptidos EspA; véase a continuación). Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican para polipéptidos EspA (y fragmentos de los mismos) y ácidos nucleicos relacionados, tales como (1) ácidos nucleicos que contienen secuencias que son complementarias a, o que se hibridan con, ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos EspA, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos que contienen al menos 12, 15, 20 ó 25 nucleótidos); y (2) ácidos nucleicos que contienen secuencias que se hibridan con secuencias que son complementarias a ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos EspA, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos que contienen al menos 12, 15, 20 ó 25 nucleótidos); pueden usarse en métodos centrados en sus propiedades de hibridación. Por ejemplo, tal como se describe en mayor detalle a continuación, tales moléculas de ácido nucleico pueden usarse en los siguientes métodos: métodos de PCR para sintetizar ácidos nucleicos de EspA, métodos para detectar la presencia de un ácido nucleico de EspA en una muestra, métodos de examen para identificar ácidos nucleicos que codifican para nuevos miembros de la familia de EspA, y métodos terapéuticos.

También se describen métodos para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican para miembros de la familia del polipéptido EspA además de los EspA mostrados en las figuras 1 y 4. En estos métodos, una muestra, por ejemplo, una biblioteca de ácidos nucleicos, tal como una biblioteca de ADNc, que contiene un ácido nucleico que codifica para un polipéptido EspA se examina con una sonda específica para EspA, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico específica para EspA. Las sondas de ácido nucleico específicas para EspA son moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas que contienen nucleótidos de ADN o ARN, o combinaciones o modificaciones de los mismos) que específicamente se hibridan con ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos EspA, o con secuencias complementarias de los mismos. El término "sonda específica para EspA", en el contexto de este método de la invención, se refiere a sondas que se unen a ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos EspA, o a secuencias complementarias de los mismos, en un grado detectable mayor que a ácidos nucleicos que codifican para otros polipéptidos, o a secuencias complementarias de los mismos. El término "sonda específica para EspA" por tanto incluye sondas que pueden unirse a ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos EspA (o a secuencias complementarias de los mismos).

La presente descripción facilita la producción de sondas de ácido nucleico específicas para EspA. Pueden diseñarse métodos para obtener tales sondas basándose en las alineaciones de secuencias de aminoácidos mostradas en las figuras 1-3. Las sondas, que pueden contener al menos 12, por ejemplo, al menos 15, 25, 35, 50, 100 ó 150 nucleótidos, pueden producirse usando cualquiera de varios métodos convencionales (véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, citado anteriormente). Por ejemplo, preferiblemente, se generan las sondas usando métodos de amplificación por PCR. En estos métodos, se diseñan cebadores que corresponden a secuencias conservadas de EspA, que pueden incluir aminoácidos específicos para EspA, y se usa el producto de PCR resultante como sonda para examinar una biblioteca de ácidos nucleicos, tal como una biblioteca de ADNc. Se identificó una secuencia de nucleótidos que codifica para EspA generalmente siguiendo este procedimiento basado en el análisis de las secuencias de EspA en las figuras 1 y 4.

Tal como se conoce en la técnica, normalmente se diseñan los cebadores de PCR para contener al menos 15 nucleótidos, por ejemplo 15-30 nucleótidos. El diseño de cebadores específicos para EspA que contienen 21 nucleótidos, que codifican para péptidos EspA que contienen 7 aminoácidos, se describe tal como sigue. Preferiblemente, la mayoría o todos los nucleótidos en una sonda de este tipo codifican para aminoácidos conservados de EspA, incluyendo aminoácidos específicos para EspA. Por ejemplo, pueden usarse cebadores que contienen secuencias que codifican para péptidos que contienen al menos el 40% de los aminoácidos conservados de EspA. Un cebador de este tipo, que contiene 21 nucleótidos, puede incluir secuencias que codifican para al menos 3 aminoácidos conservados de EspA. Por tanto, el cebador puede contener secuencias que codifican para al menos un aminoácido específico para EspA, por ejemplo, hasta 7 aminoácidos específicos para EspA. Una vez que se seleccionan secuencias de aminoácidos específicas para EspA como moldes frente a los que van a diseñarse las secuencias de cebador, pueden sintetizarse los cebadores usando, por ejemplo, métodos químicos convencionales. Tal como se describió anteriormente, debido a la degeneración del código genético, tales cebadores deben diseñarse para incluir secuencias degeneradas apropiadas, tal como puede determinar fácilmente un experto en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "espA" se refiere al polinucleótido que codifica para el polipéptido EspA. Estos polinucleótidos incluyen secuencias de ADN, ADNc y ARN que codifican para EspA. Todos los polinucleótidos que codifican para la totalidad o una parte de EspA también están incluidos en el presente documento. Tales polinucleótidos incluyen polinucleótidos que se producen de manera natural, sintéticos y

manipulados intencionadamente. Por ejemplo, un polinucleótido *espA* puede someterse a mutagénesis dirigida al sitio. La secuencia del polinucleótido *espA* también incluye secuencias antisentido. Todas las secuencias de nucleótidos degeneradas están incluidas en la invención siempre que la secuencia de aminoácidos del péptido EspA codificado por la secuencia de nucleótidos esté sin cambios funcionalmente.

5 Se dan a conocer moléculas de ácido nucleico que se hibridan con el polinucleótido descrito en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” engloba ARN así como ADNc y ADN mono y bicatenario. El polinucleótido que codifica para EspA incluye la secuencia de nucleótidos en las figuras 1 y 4, así como secuencias de ácido nucleico complementarias a esa secuencia. Una secuencia complementaria puede incluir un nucleótido antisentido. Cuando la secuencia es ARN, los desoxinucleótidos A, G, C y T de las 10 figuras 1 y 4 se sustituyen por ribonucleótidos A, G, C y U, respectivamente. También están incluidos en la invención fragmentos de las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente que tienen al menos 15 bases de longitud, lo que es suficiente para permitir que el fragmento se hibride selectivamente con ADN que codifica para la proteína de la figura 1 ó 4 en condiciones fisiológicas.

15 En reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones usadas para lograr un nivel particular de rigurosidad variarán, dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que estén hibridándose. Por ejemplo, pueden considerarse la longitud, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, contenido en GC frente a AT) y el tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN frente a ADN) de las regiones hibridantes de los ácidos nucleicos, al seleccionar las condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos se inmoviliza, por ejemplo, sobre un filtro.

20 Un ejemplo de condiciones de mayor rigurosidad progresivamente es tal como sigue: 2 x SSC/SDS al 0,1% aproximadamente a temperatura ambiente (condiciones de hibridación); 0,2 x SSC/SDS al 0,1% aproximadamente a temperatura ambiente (condiciones de baja rigurosidad); 0,2 x SSC/SDS al 0,1% aproximadamente a 42°C (condiciones de rigurosidad moderada); y 0,1 x SSC aproximadamente a 68° C (condiciones de alta rigurosidad). Puede llevarse a cabo un lavado usando sólo una de estas condiciones, por ejemplo, condiciones de alta 25 rigurosidad, o puede usarse cada una de las condiciones, por ejemplo, durante 10-15 minutos cada una, en el orden enumerado anteriormente, repitiendo cualquiera o todas las etapas enumeradas. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, las condiciones óptimas variarán, dependiendo de la reacción de hibridación particular implicada, y pueden determinarse empíricamente.

30 Las secuencias de ADN de la presente descripción pueden obtenerse mediante varios métodos. Por ejemplo, puede aislarse el ADN usando técnicas de hibridación que se conocen bien en la técnica. Éstas incluyen, pero no se limitan a (1) hibridación de bibliotecas con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogas, (2) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ADN usando cebadores que pueden aparearse con la secuencia de ADN de interés, y (3) examen con anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas.

35 Los procedimientos de examen que se basan en la hibridación de ácidos nucleicos hacen posible aislar cualquier secuencia génica de cualquier organismo, siempre que esté disponible la sonda apropiada. Las sondas de oligonucleótidos, que corresponden a una parte de la secuencia que codifica para la proteína en cuestión, pueden sintetizarse químicamente o producirse mediante fragmentación de la secuencia nativa. La síntesis química requiere que se conozcan tramos cortos de oligopéptido de la secuencia de aminoácidos. La secuencia de ADN que codifica 40 para la proteína puede deducirse a partir de código genético, sin embargo, debe tenerse en cuenta la degeneración del código. Es posible realizar una reacción de adición mixta cuando la secuencia es degenerada. Esto incluye una mezcla heterogénea de ADN bicatenario desnaturalizado. Para tal examen, se realiza preferiblemente hibridación con o bien ADN monocatenario o bien ADN bicatenario desnaturalizado. Cuando se usa en combinación con la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa, pueden clonarse incluso productos de expresión poco 45 frecuentes.

También se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican para los polipéptidos EspA, vectores y células huésped que los contienen y métodos de expresión. Tras aislarse un péptido de EspA, pueden aislarse ácidos nucleicos que codifican para el péptido mediante métodos bien conocidos en la técnica. Estos ácidos nucleicos aislados pueden ligarse en vectores e introducirse en células huésped adecuadas para la expresión. Se conocen 50 bien en la técnica métodos de ligamiento y expresión de ácidos nucleicos dentro de células (véase, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

Tal como se usa en el presente documento, los términos “*espB*” y “*eaeA*” se refieren a genes distintos a *espA* que codifican para proteínas secretadas por *E. coli* enteropatógena. Tal como se usa en el presente documento, el término “EspB” y “EaeA” se refieren a las proteínas codificadas por los genes *espB* y *eaeA*, respectivamente.

55 También se describen vectores que contienen polinucleótidos que codifican para el polipéptido EspA. Por ejemplo, el plásmido (pMSD2) con un *espA* intacto puede restaurar la secreción de la proteína EspA en una cepa deficiente en *espA*. Tal como se usa en el presente documento, “vectores” incluye plásmidos, vectores virales de ADN y ARN, vectores de baculovirus, vectores para su uso en levadura, y otros vectores bien conocidos por los expertos en la técnica. Varios tipos de vectores están disponibles comercialmente y pueden usarse para poner en práctica esta

invención. Los ejemplos de vectores útiles en la práctica de esta invención incluyen aquéllos tan variados como el vector de bajo número de copias pMW118, el vector suicida de selección positiva pCVD442 y el disponible comercialmente pBluescript II SK(+)(Stragene, La Jolla, CA).

5 Cuando el vector es un plásmido, contiene generalmente una variedad de componentes incluyendo promotores, secuencias señal, genes de selección fenotípica, sitios de orígenes de replicación, y otros componentes necesarios tal como conocen los expertos en la técnica. Los promotores usados más comúnmente en vectores procariotas incluyen el sistema de promotor *lacZ*, el promotor de fosfatasa alcalina *pho A*, el promotor del bacteriófago λ PL (un promotor sensible a la temperatura), el promotor *tac* (un promotor *trp-lac* híbrido regulado por el represor *lac*), el promotor de triptófano y el promotor del bacteriófago T7. Por ejemplo, el vector de bajo número de copias pMW118
10 bajo el control del promotor *lacZ*.

Una secuencia señal normalmente se encuentra inmediatamente en 5' con respecto al ácido nucleico que codifica para el péptido, y por tanto se transcribirá en el extremo amino-terminal de la proteína de fusión.

15 Genes típicos de selección fenotípica son los que codifican para proteínas que confieren resistencia a antibióticos a la célula huésped. Por ejemplo, gen de resistencia a ampicilina (*amp*) y el gen de resistencia a tetraciclina (*tet*) se emplean fácilmente para este fin. Para un ejemplo diferente, el casete *aphA-3*, que codifica para un gen para la resistencia a kanamicina (*kan*), puede clonarse en la región de vector que contiene polinucleótidos que codifican para el polipéptido EspA para la selección del vector sobre placas de kanamicina.

20 La construcción de vectores adecuados que contienen polinucleótidos que codifican para polipéptido EspA se prepara usando procedimientos de ADN recombinante convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Polinucleótidos aislados que codifican para el polipéptido EspA que van a combinarse para formar el vector se escinden y se ligan juntos en un orden y una orientación específicos para generar el vector deseado.

25 Se describe una célula huésped que contiene un vector que tiene un polinucleótido que codifica para el polipéptido EspA. Los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden usarse para producir células transformadas o transfectadas para la producción potenciada del EspA expresado. El EspA puede aislarse de células transformadas mediante métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. La proteína podría aislarse, por ejemplo, usando purificación de inmunofluorescencia.

30 Pueden expresarse *in vitro* secuencias de ADN que codifican para EspA mediante transferencia de ADN en una célula huésped adecuada. Las "células huésped" son células en las que puede propagarse un vector y su ADN expresado. El término también incluye cualquier progenie de la célula huésped sujeto. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica a la célula parental puesto que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Sin embargo, tal progenie está incluida cuando se usa el término "célula huésped". Se conocen en la técnica métodos de transferencia estable, lo que significa que el ADN foráneo se mantiene de manera continua en el huésped.

35 Las secuencias de polinucleótido EspA pueden insertarse en un vector de expresión recombinante. El término "vector de expresión recombinante" se refiere a un plásmido, virus u otro vehículo conocido en la técnica que se ha manipulado mediante inserción o incorporación de las secuencias genéticas de EspA. Tales vectores de expresión contienen una secuencia promotora que facilita la transcripción eficaz de la secuencia genética insertada del huésped. El vector de expresión contiene normalmente un origen de replicación, un promotor, así como genes específicos que permiten la selección fenotípica de las células transformadas.

40 Pueden expresarse secuencias de polinucleótido que codifican para EspA o bien en procariotas o bien en eucariotas. Los huéspedes pueden incluir organismos microbianos, de levaduras, insectos y mamíferos. Se conocen bien en la técnica métodos de expresión de secuencias de ADN que tienen secuencias eucariotas o virales en procariotas. Se conocen en la técnica vectores de ADN de plásmidos y virus funcionales biológicamente que pueden producir la expresión y replicación en un huésped. Se usan tales vectores para incorporar las secuencias de ADN
45 dadas a conocer en el presente documento.

La transformación de una célula huésped con ADN recombinante puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales tal como conocen bien los expertos en la técnica. Cuando el huésped es procariota, tal como *E. coli*, pueden prepararse células competentes que pueden producir la captación de ADN a partir de células recogidas tras la fase de crecimiento exponencial y tratadas posteriormente mediante el método con CaCl_2 usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, puede usarse MgCl_2 o RbCl . La transformación también puede realizarse después de formar un protoplasto de la célula huésped si se desea. Para otro ejemplo, puede usarse conjugación triparental para introducir genéticamente un vector en *E. coli*, especialmente *E. coli* enteropatógena o *E. coli* enteropatógena de conejo. Las células transformadas se seleccionan mediante crecimiento sobre un antibiótico, comúnmente tetraciclina (*tet*) o ampicilina (*amp*), al que se han vuelto resistentes debido a la presencia de los genes de resistencia *tet* o *amp* en el vector. En una realización específica, se seleccionan células basándose en la
55 resistencia a kanamicina y sacarosa.

Cuando el huésped es un eucariota, pueden usarse métodos de transfección de ADN tales como coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción

de un plásmido encapsulado en liposomas, o vectores virales. También pueden cotransformarse células eucariotas con secuencias de ADN que codifican para el EspA de la invención, y una segunda molécula de ADN foráneo que codifica para un fenotipo seleccionable, tal como el gen de timidina cinasa del herpes simple. Otro método es usar un vector viral eucariota, tal como virus del simio 40 (SV40) o virus del papiloma bovino, para infectar o transformar transitoriamente células eucariotas y expresar la proteína. (véase por ejemplo, Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982).

El aislamiento y la purificación del polipéptido expresado de manera microbiana, o fragmentos del mismo, proporcionado en el presente documento, pueden llevarse a cabo mediante medios convencionales incluyendo cromatografía preparativa y separaciones inmunológicas que implican anticuerpos monoclonales o policlonales.

Entre los organismos procariotas que pueden servir como células huésped están *E. coli* cepa JM101, *E. coli* K12 cepa 294 (número ATCC 31.446), *E. coli* cepa W3110 (número ATCC 27.325), *E. coli* X1776 (número ATCC 31.537), *E. coli* XL-1Blue (Stratagene) y *E. coli* B; sin embargo, también pueden usarse muchas otras cepas de *E. coli*, tales como HB101, NM522, NM538, NM539 y muchas otras especies y géneros de procariotas. Además de las cepas de *E. coli* enumeradas anteriormente, también pueden usarse como huéspedes bacilos tales como *Bacillus subtilis*, otras *Enterobacteriaceae* tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans* y diversas especies de *Pseudomonas*. En una realización específica, la célula huésped procariota es *E. coli* enteropatógena. En otra realización específica, la célula huésped procariota es *E. coli* enteropatógena de conejo.

Entre los organismos eucariotas que pueden servir como células huésped están cepas de levadura tales como PS23-6A, W301-18A, LL20, D234-3, INVSC1, INVSC2, YJ337. Son útiles secuencias promotoras y potenciadoras tales como gal 1 y pEFT-1. Vra-4 también proporciona una secuencia potenciadora adecuada. Secuencias útiles como orígenes de replicación funcionales incluyen ars1 y plásmido circular 2 μ .

Las bacterias Gram-negativas son un grupo diverso de organismos e incluyen espiroquetas tales como *Treponema* y *Borrelia*, bacilos Gram-negativos incluyendo los *Pseudomonadaceae*, *Legionellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae*, cocos Gram-negativos tales como *Neisseriaceae*, *Bacteroides* anaerobios, y otras bacterias Gram-negativas incluyendo *Rickettsia*, *Chlamydia* y *Mycoplasma*.

Los bacilos Gram-negativos (varillas) son importantes en la medicina clínica. Incluyen (1) las *Enterobacteriaceae*, una familia que comprende muchos géneros patógenos importantes, (2) géneros *Vibrio*, *Campylobacter* y *Helicobacter*, (3) organismos oportunistas (por ejemplo, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, y otros) y (4) géneros *Haemophilus* y *Bordetella*. Los bacilos Gram-negativos son los principales organismos hallados en infecciones de las vísceras abdominales, peritoneo y vías urinarias, también invasores secundarios de las vías respiratorias, piel quemada o con traumatismo, y sitios de resistencia disminuida del huésped. Actualmente, son la causa más frecuente de bacteriemia potencialmente mortal. Ejemplos de bacilos Gram-negativos patógenos son *E. coli* (diarrea, infección de las vías urinarias, meningitis en el recién nacido), especie *Shigella* (disenteria), *Salmonella typhi* (fiebre tifoide), *Salmonella typhimurium* (gastroenteritis), *Yersinia enterocolitica* (enterocolitis), *Yersinia pestis* (peste negra), *Vibrio cholerae* (cólera), *Campylobacter jejuni* (enterocolitis), *Helicobacter jejuni* (gastritis, úlcera péptica), *Pseudomonas aeruginosa* (infecciones oportunistas incluyendo quemaduras, de las vías urinarias, de las vías respiratorias, infecciones de heridas e infecciones primarias de la piel, ojos y oídos), *Haemophilus influenzae* (meningitis en niños, epiglotitis, otitis media, sinusitis y bronquitis) y *Bordetella pertussis* (tos ferina). *Vibrio* es un género de bacterias Gram-negativas móviles con forma de varilla (familia *Vibrionaceae*). *Vibrio cholerae* causa cólera en seres humanos; otras especies de *Vibrio* causan enfermedades de animales. *E. coli* coloniza los intestinos de los seres humanos y animales de sangre caliente, en los que son parte de la flora comensal, pero existen tipos de *E. coli* que causan enfermedades intestinales de seres humanos y animales. Incluyen la *E. coli* enteroagregativa (EaggEC, *enteroaggregative E. coli*), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, *enterohaemorrhagic E. coli*), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, *enteroinvasive E. coli*), *E. coli* enteropatógena (EPEC, *enteropathogenic E. coli*) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, *enterotoxigenic E. coli*). La *E. coli* uropatógena (UPEC, *uropathogenic E. coli*) causa infecciones de las vías urinarias. También existen *E. coli* de meningitis neonatal (NMEC, *neonatal meningitis E. coli*). Aparte de causar infecciones similares en animales como algunas de las humanas, existen enfermedades de animales específicas incluyendo: septicemia del ternero, mastitis bovina, enfermedad del edema porcino, y enfermedad respiratoria crónica en aves de corral.

Las especies *Neisseria* incluyen *N. cinerea*, *N. gonorrhoeae*, *N. gonorrhoeae* subesp. *kochii*, *N. lactamica*, *N. meningitidis*, *N. polysaccharea*, *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. subflava*, las especies asacarolíticas *N. flavescens*, *N. caviae*, *N. cuniculi* y *N. ovis*. Algunos taxonomistas también consideran que las cepas de *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* son *Neisseria*. Otras especies relacionadas incluyen *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella*, *Alysiella*, grupo CDC EF-4 y grupo CDC M-5. *Veillonella* son cocos Gram-negativos que son el homólogo anaerobio de *Neisseria*. Estos diplococos inmóviles son parte de la flora normal de la boca.

Las bacterias patógenas en el grupo de cocos aerobios Gram-negativos incluyen *Neisseria*, *Moraxella* (*Branhamella*) y el *Acinetobacter*. El género *Neisseria* incluye dos patógenos humanos importantes, *Neisseria gonorrhoeae* (uretritis, cervicitis, salpingitis, proctitis, faringitis, conjuntivitis, enfermedad inflamatoria pélvica, artritis, enfermedad diseminada) y *Neisseria meningitidis* (meningitis, septicemia, neumonía, artritis, uretritis). Se ha demostrado recientemente que otros cocos aerobios Gram-negativos que se consideraron previamente inofensivos incluyen

Moraxella (Branhamella) catarrhalis (bronquitis y bronconeumonía en pacientes con enfermedad pulmonar crónica, sinusitis, otitis media) son una causa común de infecciones en seres humanos.

Los polipéptidos EspA también pueden usarse para producir anticuerpos que son inmunorreactivos o se unen a epítomos de los polipéptidos EspA. Se proporciona un anticuerpo que consiste esencialmente en anticuerpos monoclonales combinados con diferentes especificidades epitópicas, así como distintas preparaciones de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de antígeno que contiene fragmentos de la proteína mediante métodos bien conocidos en la técnica (Kohler, *et al.*, Nature, 256:495, 1975; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, *et al.*, ed., 1989).

El término "anticuerpo" tal como se usa en esta invención incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv que pueden unir el epítomo. Estos fragmentos de anticuerpo retienen cierta capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor y se definen tal como sigue:

(1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo puede producirse mediante digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada;

(2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo puede obtenerse tratando anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

(3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos mediante dos enlaces disulfuro;

(4) Fv, definido como un fragmento modificado mediante ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y

(5) Anticuerpo de cadena sencilla, definido como una molécula modificada mediante ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas mediante un ligador peptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente.

Se conocen en la técnica métodos de preparación de estos fragmentos. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (edición actual)).

Un epítomo es cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el parátomo de un anticuerpo. Los epítomos consisten habitualmente en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen habitualmente tres características estructurales dimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Si es necesario, los anticuerpos policlonales o monoclonales pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo mediante unión a y elución de una matriz a la que se une el péptido o un péptido frente al que se producen los anticuerpos. Los expertos en la técnica conocerán diversas técnicas comunes en las técnicas de la inmunología para la purificación y/o concentración de anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Coligan, *et al.*, Unidad 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, edición actual).

También se dan a conocer epítomos peptídicos para su uso en el diseño de sondas de nucleótidos específicas para espA o anticuerpos anti-EspA. Tales sondas o anticuerpos pueden usarse para identificar proteínas o genes que pueden estar implicados en la virulencia de otros patógenos, incluyendo pero sin limitarse a polipéptidos o polinucleótidos de bacterias Gram-negativas.

Los anticuerpos, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla y similares, tienen la capacidad para unirse con alta inmunoespecificidad a las proteínas EspA, péptidos o secuencias de nucleótidos de la invención, o fragmentos de los mismos. Estos anticuerpos pueden no estar marcados o marcarse de manera adecuada. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para purificación por afinidad de EspA, por ejemplo. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden emplearse en procedimientos inmunológicos conocidos para la detección cualitativa o cuantitativa de estas proteínas o péptidos en células, muestras de tejidos, preparaciones de muestras o líquidos. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden emplearse en procedimientos inmunológicos conocidos para la detección cualitativa o cuantitativa de las secuencias de nucleótidos o partes de las mismas.

Se da a conocer un método para detectar polipéptido EspA en una muestra, que incluye poner en contacto una muestra de un sujeto con un anticuerpo contra el polipéptido EspA; y detectar la unión del anticuerpo al polipéptido EspA. La unión es indicativa de la presencia de polipéptido EspA en la muestra. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" incluye material derivado de un mamífero o sujeto humano u otro animal. Tales muestras incluyen pero no se limitan a pelo, muestras de piel, muestra de tejido, células cultivadas, medios de células cultivadas y líquidos biológicos. Por ejemplo, puede detectarse polipéptido EspA en cultivo de células HeLa (por ejemplo, humanas).

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “tejido” se refiere a una masa de células conectadas (por ejemplo, tejido del SNC, tejido neural o tejido ocular) derivado de un ser humano u otro animal e incluye el material conector y el material líquido en asociación con las células. Por ejemplo, puede hallarse *E. coli* enteropatógena de conejo en el estómago, ciego y colon de conejos. Tal como se usa en el presente documento, el término “líquido biológico” se refiere un material líquido derivado de un ser humano u otro animal. Tales líquidos biológicos incluyen pero no se limitan a sangre, plasma, suero, derivados de suero, bilis, flema, saliva, sudor, líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo (LCR), tal como LCR lumbar o ventricular.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra” también incluye disoluciones que contienen el polipéptido aislado, medios en los que se ha secretado el polipéptido y medios que contienen células huésped que producen el polipéptido EspA. Por ejemplo, una muestra puede ser una muestra de proteína que va a resolverse mediante SDS-PAGE y transferirse a nitrocelulosa para análisis de inmunotransferencia de tipo Western. La cantidad de muestra requerida para obtener una reacción puede determinarla un experto en la técnica mediante técnicas de laboratorio convencionales. La cantidad óptima de muestra puede determinarse mediante dilución en serie.
- 15 En una realización, la presencia de polipéptido EspA en la muestra es indicativa de infección por *E. coli* enteropatógena. En otra realización, la presencia de polipéptido EspA en la muestra es indicativa de infección por *E. coli* enterohemorrágica.
- 20 Se proyecta que las proteínas, fragmentos de proteína y péptidos sintéticos descritos en el presente documento tengan numerosos usos incluyendo aplicaciones de pronóstico, terapéuticas, de diagnóstico o diseño de fármacos. Las proteínas, fragmentos de proteína y péptidos sintéticos descritos en el presente documento proporcionarán la base para la preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales específicamente inmunorreactivos con las proteínas descritas en el presente documento. En una realización, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende EspA tal como se define en las reivindicaciones para inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a un organismo productor de EspA. La infección por el organismo productor de EspA se previene de ese modo. En una realización más específica, el organismo productor de EspA es una cepa de *E. coli*. En una realización incluso más específica, la cepa de *E. coli* es *E. coli* o bien enteropatógena o bien enterohemorrágica.
- 25 En otra realización, la invención proporciona la composición de vacuna descrita anteriormente para mejorar una enfermedad causada por un organismo productor de EspA.
- 30 En una realización más específica, el organismo productor de EspA es una cepa de *E. coli*. En una realización incluso más específica, la cepa de *E. coli* es *E. coli* o bien enteropatógena o bien enterohemorrágica. Se describe un método para detectar un polinucleótido *espA* en una muestra, poniendo en contacto una muestra que se sospecha que contiene polinucleótido *espA* con una sonda de ácido nucleico que se hibrida con polinucleótido *espA*; y detectando la hibridación de la sonda con polinucleótido *espA*. La detección de hibridación es indicativa de polinucleótido *espA* en la muestra.
- 35 También se describe un organismo con un gen *espA* mutado. Los organismos preferidos en los que puede mutarse un gen *espA* incluyen pero no se limitan a bacterias. Entre las bacterias en las que puede mutarse un gen *espA* están las *E. coli* en las que puede mutarse un gen *espA* están las *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica.
- 40 Se da a conocer un método recombinante para producir polinucleótido *espA*, que incluye insertar un ácido nucleico que codifica para un marcador seleccionable en el polinucleótido que codifica para polipéptido EspA. El polinucleótido resultante codifica para un polipéptido EspA recombinante que contiene el marcador seleccionable. Por ejemplo, un marcador seleccionable puede ser una etiqueta del virus del herpes simple (VHS), para la que hay anticuerpos disponibles comercialmente.
- 45 Además, se describe un método recombinante para producir polipéptido EspA, haciendo crecer una célula huésped que contiene un polinucleótido que codifica para polipéptido EspA en condiciones que permiten la expresión y secreción de polipéptido EspA; y aislando el polipéptido. También se describen métodos de producción de polipéptidos y péptidos de manera recombinante en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término “condiciones que permiten la expresión y secreción” se refiere a condiciones adecuadas de manera que se transcriba y traduzca el ácido nucleico y aislar el polipéptido así producido. El polipéptido producido puede ser una proteína secretada en los medios. Los medios incluyen un fluido, sustancia u organismo en el que puede producirse el crecimiento microbiano o en el que pueden existir microbios. Tales entornos pueden ser, por ejemplo, líquidos corporales o tejido de animales, agua y otros líquidos, alimentos, productos alimenticios o extractos alimenticios, y determinados objetos inanimados. Por ejemplo, los microbios pueden crecer en medios de Luria-Bertani (LB). No es necesario que el entorno fomente el crecimiento del microbio, sólo que permita su subsistencia.
- 50 Se da a conocer un método para identificar un compuesto que inhibe los sistemas de secreción bacteriana de tipo III, introduciendo el polinucleótido que codifica para un marcador seleccionable en bacterias que tienen un sistema de secreción bacteriana de tipo III; haciendo crecer las bacterias en condiciones que permiten el crecimiento de bacterias y la secreción del polipéptido codificado por el polinucleótido; poniendo en contacto un compuesto que se
- 55

sospecha que inhibe el sistema de secreción bacteriana de tipo III con las bacterias; induciendo la expresión del polipéptido; y detectando la secreción del polipéptido. En la práctica del método, una falta de secreción es indicativa de la inhibición de los sistemas de secreción bacteriana de tipo III. Tal como se usa en esta invención, el término “secreción de tipo III” y ruta de “secreción de tipo III” se refieren a una maquinaria especializada para exportar moléculas a través de una membrana celular. La exportación de moléculas a través de una membrana celular es un proceso crítico para mover factores de virulencia hasta la superficie en la que pueden interactuar con componentes de la célula huésped. La ruta de secreción de tipo III usa adenosina trifosfato (ATP) como fuente de energía. La ruta de secreción de tipo III es diferente de otras rutas de secreción que se encuentran en bacterias Gram-negativas, aunque es homóloga a genes de ensamblaje de fagos filamentosos y flagelos. No se asemeja a ninguna ruta de los mamíferos. Siempre se asocia con la producción de enfermedad. Los factores de virulencia secretados por la ruta de secreción de tipo III varían entre patógenos, aunque los componentes de la maquinaria de secreción de tipo III son intercambiables, al menos para *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. Además, las secuencias de polipéptido de la composición de vacuna de la invención pueden usarse para identificar compuestos o composiciones que interactúan (por ejemplo, se unen) con ellos y afectan a su actividad biológica. Tales efectos incluyen la inhibición o estimulación de la secreción o actividad de EspA.

Se da a conocer un método para producir un organismo no patógeno, generando una mutación en un polinucleótido que codifica para polipéptido EspA; insertando una secuencia de ácido nucleico que codifica para un marcador seleccionable en el sitio de la mutación; introduciendo el polinucleótido *espA* mutado en un gen *espA* cromosómico de un organismo para producir una mutación en el gen *espA* cromosómico; y seleccionando organismos que tienen la mutación. Tal como se usa en el presente documento, el término “mutación” se refiere a un cambio en la secuencia de nucleótidos de un gen, en particular, el polinucleótido que codifica para polipéptido EspA. Las mutaciones incluyen mutaciones que producen polipéptido EspA con una secuencia de aminoácidos diferente, mutaciones de cambio de sentido (incluyendo mutaciones del marco de lectura), mutaciones sin sentido (incluyendo mutaciones nulas (*knockout*)), y técnicas genéticas recombinantes que producen proteínas de fusión que contienen parte del polipéptido EspA. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica para un marcador seleccionable codifica para la resistencia a kanamicina. Por ejemplo, el casete *aphA-3*, que codifica para un gen para la resistencia a kanamicina (*kan*), puede clonarse en los polinucleótidos que codifican para el polipéptido EspA para la selección del polinucleótido *espA* mutado sobre placas de kanamicina para producir una mutación nula.

Los organismos preferidos incluyen pero no se limitan a bacterias. En otra realización, el organismo que se usa para generar una mutación en un polinucleótido que codifica para polipéptido EspA es *E. coli*. Entre las *E. coli* que pueden transformarse están *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica.

También se describe un método de activación de la actividad tirosina cinasa en una célula huésped añadiendo tanto organismos deficientes en *espA* mutantes que expresan polipéptido Eae como organismos deficientes en *eaeA* mutantes que expresan polipéptido EspA a una célula huésped y uniendo las bacterias a la célula huésped, activando de ese modo la actividad tirosina cinasa de la célula huésped en la célula. En una realización, la activación de la actividad tirosina cinasa de la célula huésped en la célula provoca la fosforilación de tirosinas de una proteína de membrana del huésped de 90 kilodalton, Hp90, y flujos de inositol fosfato (IP₃) y calcio intracelulares. Por ejemplo, puede usarse un mutante de *eaeA* para complementar un mutante de *espA* para la invasión cuando estas dos cepas mutantes se usaron para coinfectar células HeLa. Por tanto, se proporciona un método científico útil para investigar la patología mediante la biología celular.

Un kit puede contener uno o más anticuerpos descritos en el presente documento así como un kit basado en nucleótidos. En una realización, el kit es útil para la detección de polipéptido EspA y es un medio portador compartimentalizado para recibir en un recinto cerrado un recipiente que contiene un anticuerpo que se une a polipéptido EspA. Tal como se usa en el presente documento, un “medio de recipiente” incluye viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los medios de recipiente uno de los elementos independientes que van a usarse en el método. En una realización, el anticuerpo que se une a polipéptido EspA está marcado de manera detectable. En una realización más específica, el marcador se selecciona del grupo que consiste en radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico y una enzima.

En otra realización, el kit es útil para la detección de un polinucleótido *espA* y es un medio portador compartimentalizado para recibir en un recinto cerrado un recipiente que contiene la sonda de ácido nucleico que se hibrida con polinucleótido *espA*. En una realización, la sonda de ácido nucleico que se hibrida con polinucleótido *espA* está marcada de manera detectable. En una realización más específica, el marcador se selecciona del grupo que consiste en radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico y una enzima.

Puesto que EspA es una proteína secretada, es útil como pareja de fusión para la clonación y expresión de otros péptidos y proteínas. Por ejemplo, EspA fusionada a una proteína de interés se produce de manera recombinante en una célula huésped, por ejemplo, *E. coli*, y la proteína de fusión se secreta en los medios de cultivo en los que se hace crecer el huésped transformado. La proteína de fusión puede aislarse mediante anticuerpos anti-EspA seguido por la escisión de EspA del péptido o proteína de interés. Puede usarse ELISA u otros métodos de inmunoafinidad para identificar la proteína de fusión de EspA. Se da a conocer un método de producción de una proteína de fusión

de EspA que incluye hacer crecer una célula huésped que contiene un polinucleótido que codifica para EspA operativamente unido a un polinucleótido que codifica para un polipéptido o péptido de interés en condiciones que permiten la expresión y secreción de los polipéptidos de fusión y aislar el polipéptido de fusión. El término "operativamente unido o asociado" se refiere a la unión funcional entre una secuencia promotora y el gen o genes estructurales en el caso de una proteína de fusión, regulada por la secuencia promotora de ácido nucleico. El promotor operativamente unido controla la expresión del polipéptido codificado por el gen estructural (por ejemplo, la proteína de fusión).

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención. Aunque son típicos de los procedimientos que podrían usarse, pueden utilizarse alternativamente otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

10 Ejemplo 1

Análisis de la secuencia de ADN del gen de *E. coli* enteropatógena *espA*

El propósito de este ejemplo es caracterizar *espA*, un gen responsable de la actividad de fijación y destrucción de *E. coli* enteropatógena. El gen *espA* codifica para la proteína secretada de 25 kilodalton y está ubicado en el genoma de *E. coli* enteropatógena en el locus de destrucción de enterocitos entre *eaeA* y *espB*, dos loci requeridos para la adherencia íntima.

Se determinó la secuencia de ADN del locus de destrucción de enterocitos de *E. coli* enteropatógena entre *eaeA* y *espB*. Se realizó la secuenciación del ADN tal como sigue: se clonó el fragmento de ADN de Sall-BglII del locus de destrucción de enterocitos que abarca desde el interior de *eaeA* hasta estar en 5' con respecto a *espB* en el plásmido disponible comercialmente pBluescript para crear el plásmido pLCL109. Se realizó una serie de deleciones de ADN anidadas desde el extremo del plásmido pLCL109 más próximo al gen *eaeB*. Se usaron estas deleciones de ADN del plásmido pLCL109 como moldes para determinar la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas de ADN usando cebadores de oligonucleótido sintetizados según fue necesario, [³⁵S]dATP y la enzima Sequenase. Se analizaron los datos de secuencia de ADN con el paquete desarrollado por el Genetics Computer Group de la Universidad de Wisconsin.

El análisis de la secuencia de ADN mostró tres marcos de lectura abiertos. La secuencia de aminoácidos pronosticada por la secuencia de ADN en el extremo 5' del segundo marco de lectura abierto (*espA*) era idéntica a la secuencia amino-terminal de una proteína con un M_r de aproximadamente 25 kalton secretada por *E. coli* enteropatógena. No se detectaron proteínas con secuencias similares en una búsqueda de la base de datos Genbank usando el TFASTA. Por tanto, el gen *espA* codifica para la proteína de *E. coli* enteropatógena secretada.

El peso molecular pronosticado de toda la proteína codificada por *espA* es de 20.468 daltons (figura 1). Ninguna secuencia líder precede al extremo amino-terminal del producto secretado notificado. Un fuerte sitio de unión al ribosoma consenso termina siete nucleótidos antes del codón de iniciación. Se pronosticó que once de los primeros diecinueve residuos en el extremo amino-terminal eran serina o treonina.

Ejemplo 2

Construcción de una mutación en un gen *espA* en un plásmido y en un cromosoma

El propósito de este ejemplo era construir una mutación en un gen *espA* en el cromosoma de un organismo. El propósito de este ejemplo era construir una mutación en un gen *espA* en un plásmido. El plásmido puede usarse entonces para crear mutaciones en el gen *espA* de otros organismos. Se construyeron plásmidos con una mutación no polar en el gen *espA*. Además, se generó una cepa bacteriana mutante con una mutación no polar en su gen *espA* cromosómico.

Se describe un gen *espA* con una mutación no polar en la figura 2. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) generó una deleción con sitios de restricción que permiten que se clone un casete *aphA-3*, que codifica para la resistencia a kanamicina, en la región delecionada. Este casete *aphA-3* está precedido (5') por codones de terminación de la traducción en los tres marcos de lectura y seguido inmediatamente (3') por un sitio de unión al ribosoma consenso y un codón de iniciación. Se modificó mediante ingeniería genética la inserción en el gen *espA* para retener el marco de lectura del extremo 3' de *espA* y por tanto para permitir la transcripción y traducción no afectadas de los genes en sentido 3'. La secuenciación de ADN confirmó el marco de lectura de la mutación.

Se realizó la construcción de una mutación no polar en el gen *espA* en un plásmido mediante la reacción en cadena de la polimerasa tal como sigue: el molde de PCR era el plásmido pLCL114, que contiene el fragmento *Clal-BglII* de pLCL109 clonado en pBluescript. Se usaron dos pares de cebadores, el cebador universal con Donne-99 y el cebador inverso con Donne-100. Los oligonucleótidos Donne-99 y Donne-100 son los nucleótidos 4157 a 4140 y 4297 a 4324 del fragmento Sall-BglIII, respectivamente. Para propósitos de clonación, se modificó mediante ingeniería genética un sitio de restricción *NruI* en el extremo 5' tanto de Donne-99 como de Donne-100. Se construyeron los oligonucleótidos en el Laboratorio de Biopolímeros de la Universidad de Maryland en Baltimore. Se realizó PCR en muestras de 50 µl en un miniciclador. La reacción de PCR eran treinta ciclos de desnaturalización de ADN a 94°C durante un minuto, apareamiento con los cebadores a 55°C durante dos minutos y extensión del

polinucleótido a 72°C durante tres minutos. Se clonaron cada uno de los dos fragmentos amplificados resultantes en el plásmido disponible comercialmente pCRscript para crear pLC119 y pLCL120, respectivamente. Entonces se clonó el inserto de pLCL120 en pLCL119 usando Sall y NruI para crear pLCL121 que contenía la delección deseada. Entonces se insertó el casete de resistencia a kanamicina *aphA-3*, de 850 pares de bases flanqueado por sitios *SmaI*, en el sitio *NruI* de pLCL121.

Se clonó el alelo de *espA* mutado en el vector suicida de selección positiva pCVD442 y se introdujo en *E. coli* enteropatógena de tipo natural, cepa E2348/69 mediante intercambio alélico. Se construyó una cepa bacteriana mutante de *espA* tal como sigue: se clonó el fragmento Sall-SacI del plásmido con la resistencia a kanamicina *aphA-3* que contenía el gen *espA* interrumpido en el vector suicida de selección positiva pCVD442 en DH5 α *pir* para la introducción en E2348/69 mediante conjugación triparental o mediante electroporación en cubetas de 0,1 cm con un pulsador para *E. coli* fijado a 1,8 kV.

Se seleccionó un mutante de *espA* sobre placas de LB-kanamicina modificadas. La cepa mutante de *E. coli* enteropatógena resultante, UMD872, era resistente a sacarosa y kanamicina, y sensible a ampicilina. La amplificación por PCR usando los dos cebadores que flanquean la mutación, Donne-52 y Donne-73, confirmó la construcción de la mutación de *espA*. Se almacenaron las bacterias a -70°C en el 50% de caldo LB / el 50% de glicerol (vol/vol) y se hicieron crecer sobre placas de LB-agar o caldo con cloranfenicol (20 μ g/ml), ampicilina (200 μ g/ml), ácido nalidíxico (50 μ g/ml) o kanamicina (50 μ g/ml) añadidos según fue necesario.

Ejemplo 3

La perturbación del gen de *espA* de *E. coli* enteropatógena suprime la secreción de la proteína EspA.

El propósito de este ejemplo era identificar la proteína codificada por el gen *espA*. Una comparación de los datos de secuencia amino-terminal de la proteína EspA concordó con la secuencia del gen *espA* traducido. Para confirmar este resultado, se hizo crecer el mutante de delección de *espA*, UMD872, en medios de cultivo tisular radiomarcados. La delección del gen *espA* da como resultado la pérdida de la proteína secretada radiomarcada de 25 kilodalton. Este resultado se confirmó mediante inmunoprecipitación usando un antisuero anti-EPEC que reacciona con la proteína EspA secretada. El análisis de tipo Western usando antisueros anti-EPEC no mostró ninguna proteína secretada de 25 kilodalton. Se restauró la secreción de la proteína EspA cuando se transformó la cepa deficiente en *espA* en un plásmido (pMSD2) con un *espA* intacto. El aumento de producción por las bacterias de proteína EspA codificada por el plásmido redujo la secreción de las demás proteínas por la ruta de secreción de tipo III.

Ejemplo 4

Se requiere EspA de *E. coli* enteropatógena para la invasión de células epiteliales cultivadas

El propósito de este ejemplo era examinar si la proteína EspA de *E. coli* enteropatógena está implicada en la invasión de células epiteliales. La proteína EspA es necesaria para activar la ruta de transducción de señales del huésped y la invasión de células huésped.

Se infectaron monocapas de una célula de cáncer epitelial (HeLa) durante tres horas con cepas de *E. coli* enteropatógena o bien parentales de tipo natural o bien mutantes de *espA*. Se determinó el número de *E. coli* enteropatógena adherente e intracelular (es decir, invasiva). El número absoluto de bacterias adherentes a células HeLa varió entre cepas, según las velocidades de crecimiento diferentes entre las cepas de *E. coli* enteropatógena mutante y parental. Aunque la cepa mutante de *espA*, UMD872, se adhiere de manera eficaz a células epiteliales, es deficiente para la invasión. Sin embargo, UMD872 invadió las monocapas de HeLa a niveles próximos a los del tipo natural cuando el gen *espA* se complementó genéticamente por el plásmido pMSD2, que codifica para un gen *espA* intacto.

Se llevaron a cabo experimentos de coinfección de monocapas de HeLa para determinar si el comportamiento defectuoso en la invasión de cepas bacterianas con mutaciones en cualquiera de *espA*, *espB* y *eaeA* podrían complementarse genéticamente entre sí en *trans* para mediar una invasión posterior. La cepa mutante bacteriana de *eaeA* activa la señalización pero carece de adherencia íntima. La señalización mediada por una cepa mutante de *eaeA* permite que una cepa deficiente en *espB* entre en células epiteliales, pero no a la inversa. El mutante de *eaeA* complementó un mutante de *espA* para la invasión cuando se usaron estas dos cepas mutantes para coinfectar células HeLa, pero no hubo ningún aumento en la invasión de la cepa mutante de *eaeA*. En efecto, la señalización inducida por el mutante de *eaeA* más adherente condujo a un aumento de la captación del mutante de *espA*. La coinfección con cepas delecionadas de *espA* y *espB* no potenció la invasión de ninguna cepa, mostrando que *espA* y *espB* no se complementan entre sí.

Los experimentos de coinfección demostraron que como *espB*, el comportamiento del mutante de *espA* se complementó por *eaeA* pero no a la inversa. En efecto, la señalización generada por el mutante de *eaeA* más adherente condujo al aumento de la captación del mutante de *espA* que expresa íntima. En cambio, ni la cepa mutante de *espA* ni la de *espB* pudieron complementarse entre sí, implicando que ambas proteínas pueden actuar juntas en la misma etapa para inducir señalización epitelial.

Ejemplo 5EspA es esencial para inducir acontecimientos de transducción de señales en células epiteliales.

El propósito de este ejemplo era determinar si EspA es esencial para inducir acontecimientos de transducción de señales en células epiteliales. *E. coli* enteropatógena induce la fosforilación de tirosinas de una proteína de membrana de 90 kilodalton de la célula huésped y la acumulación posterior de proteínas fosforiladas, actina, y otros componentes citoesqueléticos bajo las bacterias adherentes. Se examinó la capacidad de un mutante de *espA* defectuoso para la invasión para inducir estos dos acontecimientos de señalización en células de mamíferos. A diferencia de la *E. coli* enteropatógena de tipo natural, la cepa mutante de *espA* UMD872 no pudo inducir fosforilación de Hp90 del huésped. Se restauró la capacidad para inducir este acontecimiento de fosforilación mediante un plásmido (pMSD2) que codifica para la proteína EspA.

Se realizaron los ensayos de adherencia e invasión tal como sigue: se infectaron 10^5 células HeLa hechas crecer en DMEM, con las diversas cepas de *E. coli* enteropatógena (m.o.i. de 1:100) durante tres horas. Se hicieron crecer células HeLa a 37°C con el 5% de CO₂ en medio de Eagle mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con el 10% (vol/vol) de suero de ternero fetal. Se lavaron las monocapas tres veces en solución salina tamponada con fosfato antes de lisis en Triton al 1% (vol/vol) en solución salina tamponada con fosfato y sembrar como dilución en serie sobre placas de LB-agar. Para los ensayos de invasión, se incubaron las monocapas lavadas con gentamicina (100 µg/ml) durante una hora para destruir las bacterias externas antes del lavado, lisis y siembra en placas.

Se infectaron las monocapas de células HeLa durante tres horas con cepas de *E. coli* enteropatógena de tipo natural o mutante. Se aislaron las proteínas insolubles y solubles en Triton X-100 epiteliales de las células HeLa. Se resolvieron muestras de proteínas mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa antes de tratar con sonda con anticuerpos específicos anti-fosfotirosina.

Se logró el aislamiento de proteínas secretadas por *E. coli* enteropatógena y proteínas celulares de HeLa tal como sigue: se sembraron placas de cultivo tisular durante la noche con 10^6 células HeLa. Antes de la infección, se sustituyeron los medios por DMEM menos metionina/cisteína que contenía cicloheximida (100 µg/ml). Se hicieron crecer células HeLa a 37°C con el 5% de CO₂ en DMEM complementado con el 10% (vol/vol) de suero de ternero fetal. Se añadió *E. coli* enteropatógena (m.o.i. de 100:1) y se incubó durante 2,5 horas a 37°C en un incubador con el 5% de CO₂ antes de añadir ³⁵S-cisteína/metionina 200 µg/ml durante 30 minutos. Se retiró el sobrenadante de cultivo y se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación (18.000x g, 10 minutos). Se precipitaron las proteínas secretadas en el sobrenadante mediante la adición de ácido tricloroacético enfriado con hielo (10% vol/vol) y se incubaron en hielo durante 60 minutos. Se sedimentaron las proteínas mediante centrifugación como anteriormente y se resuspendieron en tampón de muestra de Laemelli. Se resolvieron las muestras mediante SDS-PAGE al 12% y se examinaron los perfiles de proteínas mediante autorradiografía o se transfirieron a nitrocelulosa antes de tratar con sonda con anticuerpos anti-EPEC.

Todas las cepas de *E. coli* enteropatógena mostraron una proteína Ep85 de 85 kilodalton con tirosinas fosforiladas en la fracción insoluble, confirmando la presencia de las cepas de *E. coli* enteropatógena en la monocapa.

Se analizaron las proteínas con fosfotirosinas de HeLa tal como sigue: se lavaron las monocapas de HeLa infectadas tres veces con solución salina tamponada con fosfato en frío antes de la lisis en Triton al 1% X-100 en presencia de inhibidores de proteasa. Se aislaron las fracciones insoluble y soluble en Triton, se resuspendieron en tampón de muestra de Laemelli, y se analizaron para determinar la presencia de proteínas con fosfotirosinas mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos anti-fosfotirosina.

El examen de células HeLa infectadas mediante microscopía de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-fosfotirosina marcados de manera fluorescente o rodamina-faloidina mostró que, a diferencia de la *E. coli* enteropatógena de tipo natural parental, el mutante de *espA* no acumulaba proteínas con tirosinas fosforiladas ni actina citoesquelética bajo las microcolonias adherentes. Sin embargo, pudo restaurarse la acumulación de fosfotirosina y actina usando una cepa que portaba el gen *espA* en el plásmido pMSD2.

Se realizó microscopía de inmunofluorescencia tal como sigue: se infectaron células HeLa que se sembraron sobre portaobjetos de vidrio redondos, con *E. coli* enteropatógena o una cepa mutante durante tres horas. Entonces se lavaron las monocapas y se fijaron en paraformaldehído al 2,5% antes de la tinción para determinar actina filamentosa (usando faloidina-rodamina) o con anticuerpos anti-fosfotirosina con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína apropiado.

Ejemplo 6Caracterización de proteínas de virulencia secretadas por *E. coli* enteropatógena de conejo (RDEC-1), EspA y EspB

El propósito de este ejemplo era investigar la estructura de EspA y EspB en *E. coli* enteropatógena de conejo (RDEC-1). Se clonaron los genes *espA* y *espB* y se compararon sus secuencias con las de *E. coli* enteropatógena (EPEC). La proteína EspA mostró cierta similitud (identidad del 88,5%). La proteína EspB era heterogénea en regiones internas (identidad del 69,8%), pero era idéntica a una cepa de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Se realizaron la clonación y el análisis de secuencia de los genes *espA* y *espB* tal como sigue: se obtuvo el fragmento de ADN que codifica para *espA* y *espB* de RDEC-1 mediante PCR a partir de ADN cromosómico de RDEC-1 usando cebadores derivados de la secuencia publicada de *E. coli* enteropatógena. Se usó ADN polimerasa Vent para PCR para amplificar el ADN cromosómico de RDEC-1 y cepas de *E. coli* enteropatógena. Se llevó a cabo la reacción de PCR durante treinta ciclos de desnaturalización a 94°C durante un minuto, apareamiento a 55°C durante un minuto y elongación a 72°C durante dos minutos. Se ligó el producto de 4,3 kilopares de bases resultante en el plásmido disponible comercialmente pBluescript y se secuenciaron ambas cadenas. Se realizó la secuenciación de ADN tal como sigue: se amplificó el fragmento de ADN de 4,3 kilopares de bases que codifica para los genes *espA* y *espB* mediante PCR usando los cebadores AA01(+) y MS11(-), y ADN cromosómico de RDEC-1 como el molde de ADN. Se digirió el fragmento de extremos romos resultante con Sall y se clonó en el sitio Sall-Smal del plásmido disponible comercialmente pBluescript-II SK (+). La secuencia de ADN de *espA* de RDEC-1 y ambas cadenas usando el kit disponible comercialmente Taq DyeDeoxy. (figura 3).

Se hallaron dos marcos de lectura abiertos en la región clonada y estas secuencias de ADN eran similares a *espA* y *espB* de *E. coli* enteropatógena. El peso molecular pronosticado de EspA de RDEC-1 (192 aminoácidos) era de 23.533 dalton, y de EspB de RDEC-1 (314 aminoácidos) de 33.219 dalton. EspA de RDEC-1 era algo similar a la de *E. coli* enteropatógena con una identidad del 88,5% (figuras 4A y 4B).

En un resultado inesperado, la proteína EspB de RDEC-1 era idéntica a la EspB notificada recientemente de *E. coli* enterohemorrágica, cepa 413/89-1, serotipo 026, que se aisló originariamente de un ternero y se aisló también de pacientes con síndrome hemolítico urémico, aunque se produjeron dos diferencias de nucleótido en las posiciones de 12 (T por C) y 729 pares de bases (G por T). Además, EspB de RDEC-1 mostró un enc. del 70,3% y una identidad del 69,8%, respectivamente con respecto a los de cepas de *E. coli* enterohemorrágica, serotipo 0157 y *E. coli* enteropatógena. Se encontraron pequeñas deleciones de secuencia en EspB de RDEC-1 y *E. coli* enterohemorrágica (serotipos 026 y 0157) en las mismas posiciones cuando se compararon con las secuencias de *E. coli* enteropatógena (figuras 4A-C).

Estos resultados muestran que RDEC-1 codifica para los genes *espA* y *espB*, y que el polipéptido EspA pronosticado está altamente conservado en RDEC-1 y *E. coli* enteropatógena. Sin embargo EspB es más similar a la de *E. coli* enterohemorrágica más que a *E. coli* enteropatógena. Un marco de lectura abierto en sentido 3' con respecto a *espA* mostró similitud con EspD de *E. coli* enteropatógena, una proteína secretada que modula la secreción de EspB y es necesaria para activar rutas de transducción de señales del huésped (datos de EMBL GenBank, n.º de registro Y09228). Estos resultados muestran que *espD* también está ubicado entre *espA* y *espB* en RDEC-1.

Ejemplo 7

Caracterización de EspA y EspB de RDEC-1

El propósito de este ejemplo era investigar la función de EspA y EspB en *E. coli* enteropatógena de conejo (RDEC-1). Las mutaciones en *espA* y *espB* de RDEC-1 revelaron que los productos génicos de RDEC-1 son esenciales para activar las rutas de transducción de señales del huésped y la invasión en células HeLa. La complementación con plásmidos que contienen *espA* y *espB* de *E. coli* enteropatógena en cepas mutantes de RDEC-1 demostró que eran funcionalmente intercambiables, aunque las proteínas de *E. coli* enteropatógena mediaban niveles superiores de invasión. Además, la máxima expresión de proteínas secretadas por RDEC-1 y *E. coli* enteropatógena se produjo a las temperaturas corporales de sus huéspedes respectivos, lo que puede contribuir a la falta de infectividad de *E. coli* enteropatógena en conejos.

Para confirmar el papel de *espA* y *espB* de RDEC-1 en las rutas de transducción de señales epiteliales del huésped, se obtuvo mediante ingeniería genética una mutación de codón de terminación no polar en *espA* y *espB*. Se construyeron dos vectores suicidas y se introdujeron en la cepa de tipo natural RDEC-1 mediante retroconjugación. Se confirmaron las cepas mutantes resultantes, AAF001ΔA (EspA⁻), AAF001ΔB (EspB⁻) y la cepa doble mutante AAF001ΔAB (EspA⁻/EspB⁻) mediante digestión con BglII.

Se realizó la construcción de las mutaciones de codón de terminación no polares en genes *espA* y *espB* de RDEC-1 tal como sigue: se amplificó el fragmento de ADN de 2,7 kilopares de bases del locus de destrucción de enterocitos que codifica para los genes *espA* y *espB*, mediante PCR usando los cebadores BK25(+) y MSII(-), y pORF123B como molde de ADN. Se digirió el fragmento de extremos romos resultante con EcoRI y se clonó en el sitio EcoRI-Smal del vector pBluescript II SK(+) para obtener pORF23B. Se clonó un fragmento de ADN de EcoRI-BglIII de 1,1 kilopares de bases de pORF23B que contenía *espA* en el sitio EcoRI-BamHI de pBluescript II SK (+) para obtener pORF23.

Para construir una mutación no polar en *espA*, se llevó a cabo PCR inversa usando los cebadores Δ*espA*(+) y Δ*espA*(-) que contienen un sitio de restricción BglII y un codón de terminación usando pORF23 circular como molde de ADN. Entonces se ligó con extremos romos el producto de PCR para obtener pORF23Δ. El plásmido resultante contenía un codón de terminación y un sitio BglII de 235 pares de bases en sentido 3' con respecto al codón de iniciación de *espA*, que se confirmó mediante secuenciación de ADN. Se insertó el fragmento de ADN de Sall-SacI

de 1,1 kilopares de bases que contenía la mutación de *espA* de pORF23A en los mismos sitios del vector suicida pCVD442, que contiene el gen *sacB* para selección positiva y un gen de resistencia a ampicilina, para obtener pAA23Δ. Se introdujo el plásmido resultante en *E. coli* SM10λpir y se retroconjugó en RDEC-1 que albergaba pACYC184.

5 Para la mutación no polar en *espB*, se llevó a cabo PCR inversa usando los cebadores Δ*espB*(+) y Δ*espB*(-), y pBxb como molde de ADN. pBxb contiene el fragmento XbaI de 1,4 kilopares de bases de pORF23B que codifica para *espB* clonado en el vector pBluescript. Se autoligó el producto de PCR resultante para obtener pBxbΔ que contenía un codón de terminación y un sitio BglII introducidos por los cebadores Δ*espB*(-) y Δ*espB*(+). Se deletó el gen *esp* resultante en pBxbΔ en 250 pares de bases, empezando 154 pares de bases en sentido 3' con respecto al codón de iniciación de *espB*. Se insertó el fragmento de ADN del sitio Sall-SacI de 1,1 kilopares de bases que contenía la mutación de *espB* de pBxbA, en el mismo sitio de pCVD442 para obtener pAABxbΔ. Se transformó el plásmido resultante en *E. coli* SM10λpir y se retroconjugó en RDEC-1 que albergaba pACYC184. Para establecer mutaciones dobles en *espA* y *espB*, se introdujo pAABxbΔ en la cepa AAF001ΔA (EspA⁻). Se confirmaron tres cepas mutantes no polares de RDEC-1 mediante sus fenotipos que mantienen la resistencia a sacarosa y cloranfenicol, y la sensibilidad a ampicilina. Para confirmar las inserciones de codón de terminación en *espA* y *espB*, se preparó ADN cromosómico de cada cepa mutante y se realizó PCR con cebadores que englobaban los genes *esp*. Se digirieron los productos de PCR resultantes con BglII para confirmar la presencia de este sitio de restricción modificado mediante ingeniería genética. Se designaron las cepas mutantes que contenían el codón de terminación en *espA* o/y *espB* como AAF001ΔA (EspA⁻), AAF001ΔB (EspB⁻) y AAF001ΔAB (EspA⁻/EspB⁻), respectivamente.

20 Se realizaron mutaciones de vuelta al tipo natural ("retromutación") para confirmar que vectores suicidas no afectan a la región flanqueante respectiva u otros loci. Se obtuvieron dos cepas retromutantes mediante retroconjugación de los vectores suicida pAA23 y pAABxb en las cepas AAF001ΔA (EspA⁻) y AAF001ΔB (EspB⁻). Se confirmaron las cepas retromutantes resultantes, AAF003 y AAF004, mediante PCR y digestión con BglII. Se realizó la construcción de retromutaciones en cepas de EspA y EspB tal como sigue: se insertó el fragmento de ADN de Sall-SacI de 1,1 kilopares de bases de pORF23 que contenía *espA* en los sitios Sall-SacI de pCVD442 para obtener pAA23. Se insertó el fragmento de ADN de Sall-SacI de 1,4 kilopares de bases de pBxb en el sitio Sall-SacI de pCDD442 para obtener pAAFBxb. Se introdujeron pAA23 y pAABxb en SMλpir y se retroconjugaron en AAF001AA y AAF001AB. Se confirmaron las cepas retromutantes resultantes tal como se describió anteriormente y se designaron como AAF002 (EspA⁺) y AAF003 (EspB⁺).

30 Se realizó la clonación de los genes *espA* y *espB* de *E. coli* enteropatógena tal como sigue: se amplificó el fragmento de ADN de 2,8 kilopares de bases que codifica para *espA* y *espB* mediante PCR usando los cebadores EespA(+) y EespB (-) con ADN cromosómico de *E. coli* enteropatógena 2348/69 como molde. Se digirió este fragmento con BamHI y Sall y se introdujo en el sitio BamHI-Sall del vector de bajo número de copias pMW118 bajo el control del promotor *lacZ*, para obtener pMWespAB. Se digirió pMWespAB con BglII que tiene un sitio de restricción en el marco de lectura abierto de *espD*, se hicieron sus extremos romos con el fragmento Klenow, y luego se autoligó para obtener pMW6espD. También se digirió pMWespAB con BglII y BamHI, y luego se autoligó para obtener pMWespB. Se digirió pMWespAB con BglII-Sall, y se rellenó con el fragmento Klenow, luego se autoligó para obtener pMWespA.

40 Se analizó el perfil de secreción de RDEC-1 y sus cepas mutantes en medios de cultivo tisular. *E. coli* enteropatógena secreta cinco proteínas, de 110 kilodalton (EspC), 40 kilodalton, 39 kilodalton, 37 kilodalton (EspB) y 25 kilodalton (EspA) en medios de cultivo. RDEC-1 mostró un perfil de secreción similar, con la excepción de que no secretó una proteína equivalente a EspC. No se requiere EspC para la inducción por *E. coli* enteropatógena de rutas de transducción de señales del huésped. Aunque dos proteínas secretadas (de 40 y 39 kilodalton) eran difíciles de resolver, estas proteínas pudieron resolverse usando diferentes condiciones de SDS-PAGE. RDEC-1 secretó dos proteínas con movilidad similar a EspA y EspB de *E. coli* enteropatógena.

45 Se prepararon proteínas secretadas por RDEC-1 tal como sigue: se diluyeron cultivos bacterianos durante la noche 1:100 en DMEM y se incubaron hasta una densidad óptica de 1,0 a 600 nm (DO600). Para las cepas mutantes de RDEC-1 que contenían plásmidos recombinantes de *espA* y *espB* de *E. coli* enteropatógena, se les añadió isopropiltiogalactósido (IPTG) en DMEM para inducir la transcripción. Se retiraron las bacterias mediante centrifugación (18.000 x g, 10 minutos) y se precipitó el sobrenadante mediante la adición de ácido tricloroacético enfriado en hielo al 10%, y se incubó en hielo durante una hora. Después de centrifugación, se resuspendieron los sedimentos en tampón de muestra de Laemmli y se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%.

50 Ambas proteínas EspA y EspB reaccionan de manera cruzada frente a antiseros anti-EspA de *E. coli* enteropatógena y anti-EspB de *E. coli* enteropatógena en inmunotransferencias de tipo Western, indicando que RDEC-1 también secreta las proteínas EspA y EspB. Se usaron anticuerpos policlonales de conejo contra EspA y EspB de *E. coli* enteropatógena en inmunotransferencias de tipo Western.

55 Las cepas mutantes AAF001ΔA, AAF001ΔB y AAF001ΔAB carecen de secreción de las proteínas EspA, EspB y EspA/EspB, respectivamente, tal como se evaluó mediante su perfil de secreción y análisis de inmunotransferencia de tipo Western. EspB, cuyo gen está ubicado en sentido 3' con respecto a *espA*, todavía se secretó en la cepa

mutante AAF00ΔA (EspA⁻), indicando que la mutación de inserción de codón de terminación no afecta a la expresión de genes en 3'. Estos resultados también confirman que las proteínas EspA y EspB de RDEC-1 están codificadas por las secuencias que se designan como *espA* y *espB*. Además, las dos cepas retromutantes AAF002 y AAF003, que se derivaron originariamente de AAF001ΔA (EspA⁻) y AAF001ΔB (EspB⁻), expresaron ahora las proteínas secretadas originales, indicando que cada mutación no polar en AAF001ΔA y AAF001ΔB es tal como se pronostica, y no afecta a genes y otros loci en sentido 3'. Aunque las movilidades de EspA y EspB de RDEC-1 en SDS-PAGE fueron ligeramente más rápidas que las de *E. coli* enteropatógena, las masas moleculares calculadas de EspA y EspB de RDEC-1 fueron superiores a las de *E. coli* enteropatógena.

Disminuyó la cantidad de las otras proteínas secretadas en las cepas EspA⁻, EspB⁻, EspA⁻/EspB⁻ cuando se compararon con la cepa RDEC-1 de tipo natural. Además, la disminución de la secreción detectable de las proteínas de 40 kilodalton y 39 kilodalton en la cepa EspA⁻/EspB⁻ es mayor que la encontrada en las cepas EspA⁻ y EspB⁻. La secreción de proteínas de *E. coli* enteropatógena, excepto EspC, está mediada por un sistema de secreción de tipo III codificado por la agrupación *sep*. Es posible que el truncamiento de EspA o EspB insertando un codón de terminación pueda interferir con esta ruta de secreción o regulación por retroalimentación de este sistema, afectando de este modo a la secreción de las otras proteínas secretadas dependientes de tipo III.

Las proteínas Esp son necesarias para activar la ruta de transducción de señales del huésped. Las proteínas EspA y EspB de *E. coli* enteropatógena inducen rutas de transducción de señales del huésped que dan como resultado la acumulación de proteínas con tirosinas fosforiladas, actina citoesquelética, y otros componentes bajo las bacterias adherentes. Para determinar si EspA y EspB de RDEC-1 desencadenan estos acontecimientos en células HeLa, se tiñeron la actina citoesquelética y las proteínas con tirosinas fosforiladas, con rodamina-faloidina y anticuerpo anti-fosfotirosina marcado de manera fluorescente. Aunque el nivel de acumulación de actina citoesquelética y proteína con tirosinas fosforiladas bajo la RDEC-1 fijada es menor que el de *E. coli* enteropatógena, estos comportamientos no pudieron distinguirse de los de *E. coli* enteropatógena. En cambio, las cepas EspA⁻, EspB⁻ y EspA⁻/EspB⁻ de RDEC-1 no acumularon actina citoesquelética ni proteínas con tirosinas fosforiladas bajo las bacterias fijadas. Sin embargo, las cepas retromutantes AAF003 y AAF004 acumularon estas proteínas de manera similar a las cepas parentales.

Cuando se introdujeron plásmidos que contenían *espA* o *espB* o ambos de *E. coli* enteropatógena en las cepas EspA⁻, EspB⁻ y EspA⁻/EspB⁻ de RDEC-1, también se restauró la acumulación de actina citoesquelética y proteínas con tirosinas fosforiladas. Sin embargo, cuando se coinfectó la cepa EspA⁻ de *E. coli* enteropatógena, que todavía secreta EspB, con EspB de RDEC-1, no se restauró la inducción de acontecimientos de transducción de señales del huésped. EspB de *E. coli* enteropatógena tampoco complementó EspA de RDEC-1 en el experimento de coinfección. Por tanto, funcionalmente EspA y EspB son similares en RDEC-1 y *E. coli* enteropatógena con respecto a la activación de rutas de transducción de señales del huésped, aunque es necesario que ambas proteínas se secreten por la misma cepa.

Pudo detectarse Hp90 con tirosinas fosforiladas mediante inmunotransferencia cuando se infectaron células HeLa con *E. coli* enteropatógena. No pudo detectarse Hp90 con tirosinas fosforiladas con células infectadas por RDEC-1, aunque pudieron observarse proteínas con tirosinas fosforiladas bajo células bacterianas RDEC-1 adherentes mediante inmunofluorescencia.

E. coli enterohemorrágica no induce la fosforilación de tirosinas en células HEP-2 y T84 tal como se evaluó mediante microscopía de inmunofluorescencia. Los resultados de secuenciación mostraron que EspB de RDEC-1 es más similar a la de *E. coli* enterohemorrágica que de *E. coli* enteropatógena. Estos resultados en este ejemplo muestran que la menor acumulación de proteínas con tirosinas fosforiladas durante la infección por RDEC-1 se debe a una menor eficacia de adherencia de RDEC-1 debido a diferencias en los niveles de adhesión o heterogeneidad de las proteínas Esp o ambas.

Capacidad de adherencia y de invasión. EspA y EspB de *E. coli* enteropatógena no sólo están implicadas en la activación de rutas de transducción de señales del huésped, sino que también son necesarias para la invasión *in vitro*. Con el fin de investigar el papel de EspA y EspB de RDEC-1 en la adherencia y la invasión, se compararon las cepas mutantes de RDEC-1 *esp* con las de RDEC-1. La capacidad de adherencia de las cepas EspA⁻, EspB⁻ y EspA⁻/EspB⁻ era similar a la de la cepa RDEC-1 de tipo natural, indicando que la adherencia es independiente de la expresión de EspA y EspB. Aunque la capacidad invasiva de RDEC-1 de tipo natural era aproximadamente noventa veces menor que la de *E. coli* enteropatógena, esta capacidad disminuyó adicionalmente en las cepas mutantes EspA⁻, EspB⁻ y EspA⁻/EspB⁻. Sin embargo, se restauró la invasión mediante las cepas de retromutación AAF002 y AAF003. Estos resultados muestran que la capacidad de invasión de RDEC-1 depende de EspA y EspB.

Para determinar la capacidad de EspA y EspB de *E. coli* enteropatógena para complementar los mutantes de RDEC-1, se introdujeron diversos plásmidos que contenían los genes *espA* y *espB* de *E. coli* enteropatógena en las cepas mutantes de RDEC-1, y se compararon las eficacias de invasión con las de la cepa RDEC-1 de tipo natural. De manera interesante, los niveles de invasión de AAF0010ΔB (EspA⁻/EspB⁻ de RDEC-1) que albergaba pMWespAB (EspA+/EspB+ de EPEC) fueron cuatro veces mayor que los de RDEC-1 de tipo natural, aunque la cantidad de EspA y EspB de *E. coli* enteropatógena secretadas en la cepa AAF0010ΔB era menor que la que se encuentra normalmente en RDEC-1. Por tanto, los diferentes niveles de invasión observados entre cepas de *E. coli*

enteropatógena y RDEC-1 en células HeLa puede atribuirse a las proteínas Esp, y EspA y EspB de *E. coli* enteropatógena son más eficaces en la mediación de la invasión en este modelo de cultivo tisular. Las comparaciones de homología mostraron que EspA estaba altamente conservada en RDEC-1 y *E. coli* enteropatógena, pero EspB era más heterogénea, mostrando que la diferencia de capacidades invasivas entre RDEC-1 y *E. coli* enteropatógena pueden deberse a la proteína EspB. De manera interesante, *E. coli* enterohemorrágica 0157 se adhiere a, pero no invade células epiteliales ileocecales humanas (HCT-8). EspB de RDEC-1 era más similar a la de *E. coli* enterohemorrágica más que de *E. coli* enteropatógena, quizás enfatizando el papel de EspB en la invasión. Estos hallazgos respaldan fuertemente que la heterogeneidad de Esp afecta a la capacidad invasiva de *E. coli* enteropatógena, RDEC-1 y *E. coli* enterohemorrágica.

El mutante de EspD afecta a la secreción de EspA y EspB. *E. coli* enteropatógena contiene un marco de lectura abierto, *espD*, ubicado entre *espA* y *espB*. Para confirmar el papel del producto de *espD* en la secreción, se construyó el plásmido pMWespD que codifica para *espA* de *E. coli* enteropatógena, Δ *espD* (mutación del marco de lectura en el sitio BgIII) y se introdujo en la cepa doble mutante de RDEC-1, AAF001AAB. La cantidad de las proteínas EspA y EspB de *E. coli* enteropatógena secretadas en AAF001AAB [pMWespD] fue menor que en AAF001AAB [pMWespAB], que contiene el fragmento que codifica para los genes *espA*, *espD* y *espB* de *E. coli* enteropatógena intacta. Además también disminuyó la capacidad de invasión. Estos resultados muestran que la perturbación de *espD* afecta a la secreción de las proteínas EspA y EspB de *E. coli* enteropatógena. En este ejemplo, se muestra que mutaciones en *espA* y/o *espB* también redujeron la cantidad de las otras proteínas secretadas, debido probablemente a sus productos truncados. Disminuyeron más los niveles de secreción en dobles mutantes de *espA* y *espB* en comparación con mutantes de *espA* o *espB*. Por tanto, EspD de *E. coli* enteropatógena truncada puede afectar a la secreción de EspA y EspB en AAF001AAB [pMW6espD] debido a interferencia en el sistema de secreción de tipo III. Todavía no está claro si EspD está directamente implicada o no en este sistema de secreción.

Las proteínas secretadas por *E. coli* enteropatógena y RDEC-1 están fuertemente controladas por las temperaturas, que corresponden a las temperaturas corporales de sus huéspedes relevantes. La temperatura regula la expresión de las proteínas secretadas por *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterohemorrágica 413/89-1. Aumentó enormemente la expresión de EspB cuando se cambió la temperatura de 20°C a 37°C. Dado que las proteínas EspA y EspB están reguladas por las temperaturas corporales de huéspedes apropiados, se inocularon cepas RDEC-1 y *E. coli* enteropatógena de tipo natural en DMEM y se prepararon las proteínas secretadas tras incubación a diversas temperaturas, se analizaron luego mediante SDS-PAGE. La expresión de las proteínas secretadas por *E. coli* enteropatógena fue visible a 33°C y alcanzaron el máximo nivel de secreción a 36°C. Disminuyó la expresión a 39°C, y no se observaron proteínas secretadas a 42°C. En cambio, la máxima expresión de proteínas secretadas por RDEC-1 se produjo a 39°C y estas proteínas todavía se expresaron a 42°C. Estos resultados muestran que la máxima expresión de proteínas Esp en *E. coli* enteropatógena y RDEC-1 se activa por la temperatura corporal de sus huéspedes relevantes, ser humano (37°C) y conejo (39°C).

En conclusión, ambas proteínas eran necesarias para activar rutas de transducción de señales del huésped y la invasión. Los experimentos de complementación usando genes *esp* de *E. coli* enteropatógena revelaron que los acontecimientos de transducción de señales del huésped desencadenados por RDEC-1 y *E. coli* enteropatógena parecen estar mediados por las mismas proteínas secretadas. Finalmente, la expresión óptima de las proteínas secretadas por RDEC-1 y *E. coli* enteropatógena se correlacionó con la temperatura corporal de su huésped natural. Esto explica su estricta especificidad de huésped y la falta de infección por *E. coli* enteropatógena en conejos u otros animales. Los estudios de infección en animales usando cepas de *espA* y *espB* de RDEC-1 proporcionarán información sobre el papel de estas proteínas secretadas en la virulencia, y posiblemente pueden ser útiles para estudios de vacunas.

Ejemplo 8

Dos proteínas secretadas por *E. coli* enteropatógena de conejo (RDEC-1), EspA y EspB, son factores de virulencia

El propósito de este ejemplo es demostrar el papel de las proteínas EspA y EspB en la patogenia. Para investigar el papel de estas proteínas en la virulencia, se construyeron mutaciones en *espA* y *espB* en la cepa de *E. coli* enteropatógena de conejo, RDEC-1.

Se inocularon RDEC-1 y sus cepas mutantes de *espA* y *espB* por vía buco-gástrica en conejos jóvenes. Se encontró la mayor parte de RDEC-1 en el ciego y el colon una semana tras la infección. Sin embargo, disminuyó enormemente el número de cualquier cepa mutante en estos tejidos en comparación con la cepa parental. RDEC-1 se adhirió específicamente a la amígdala intestinal (epitelio asociado al folículo) y también se observó colonización bacteriana en el ciego, indicando que la amígdala intestinal en el ciego es un importante sitio de colonización para este patógeno. Los niveles de adherencia de las cepas EspA⁻ y EspB⁻ a la amígdala intestinal fueron 70 y 8000 veces menores que los de la cepa parental. Estos resultados muestran que la capacidad de adherencia y el tropismo de tejido de RDEC-1 dependen de las dos proteínas secretadas Esp. Además, EspB parece desempeñar un papel más crítico que EspA en la patogenia y la colonización bacteriana. Esta es la primera demostración de que las proteínas secretadas por *E. coli* enteropatógena, EspA y EspB, que están implicadas en la activación de rutas de transducción de señales de células del huésped, también son necesarias para la colonización y virulencia.

- 5 Se realizaron infecciones en animales tal como sigue: se recogieron cultivos bacterianos durante la noche mediante centrifugación y se resuspendieron en un ml de solución salina tamponada con fosfato. Se dejaron en ayuno durante la noche conejos blancos New Zealand (peso de 1,0 a 1,6 kg), luego se inocularon cinco ml de bicarbonato de sodio estéril al 2,5% y un ml de cepas de RDEC-1 o *espA* o *espB* ($2,5 \times 10^{10}$) en el estómago usando tubos buco-gástricos. Se inoculó la misma dosificación de bacterias en cada conejo al día siguiente.
- 10 Se realizaron evaluaciones clínicas tal como sigue: se pesó cada conejo diariamente y se recogió la diseminación fecal de las bacterias mediante hisopos rectales y a partir de excrementos fecales. Se hicieron rodar los hisopos rectales sobre la mitad de la superficie de placas de MacConkey que contenían ácido nalidíxico. Se recogieron cinco excrementos fecales o la misma cantidad de excremento líquido de cada conejo y se resuspendieron en tres ml de solución salina tamponada con fosfato y se sembraron 0,1 ml de cada suspensión de excrementos sobre placa de MacConkey que contenía ácido nalidíxico. Se puntuó el crecimiento de colonias resistentes a ácido nalidíxico tal como sigue: 0, sin crecimiento; 1, colonias ampliamente separadas; 2, colonias estrechamente separadas; 3, crecimiento confluyente de colonias.
- 15 Se realizaron la toma de muestras y la preparación de tejido tal como sigue: se extirparon los tejidos inmediatamente tras el sacrificio mediante inyección intravenosa de ketamina y sobredosis con fenobarbital sódico.
- 20 Se sometió a ensayo la cantidad de colonización bacteriana en tejidos intestinales tal como sigue: se ligaron de forma doble segmentos intestinales (10 cm), excepto el ciego, en sus extremos proximales y distales, y se diseccionaron entre las partes con doble ligadura, luego se lavaron con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo. Se añadió un grado del contenido viscoso del ciego a 9 ml de solución salina tamponada con fosfato. Se diluyeron las suspensiones de solución salina tamponada con fosfato resultantes y se sembraron sobre placas de MacConkey que contenían ácido nalidíxico.
- 25 Se sometió a ensayo la cantidad de adherencia bacteriana a tejidos intestinales tal como sigue: se extirparon muestras de tejido usando un sacacorchos de nueve mm de diámetro, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato, se añadieron a dos ml de solución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo, y se homogeneizaron con un homogeneizador, luego se sembraron muestras diluidas en serie sobre placas de MacConkey. Se calcularon los números de bacterias adherentes a cada tejido por centímetro cuadrado tal como sigue: $\text{UFC/cm}^2 = \text{el número de bacterias/placa} \times \text{factor de dilución} \times 2 \text{ ml} \sim 0,452$

Ejemplo 9

Desarrollo de un ensayo para examinar para determinar inhibidores de la secreción bacteriana de tipo III

- 30 El propósito de este ejemplo es proporcionar un ensayo para examinar para determinar inhibidores de la secreción bacteriana de tipo III.
- 35 Se fusiona un polinucleótido que codifica para el polipéptido EspA a varias moléculas bien conocidas, incluyendo una etiqueta de VHS. La fusión génica todavía se secreta a partir de *E. coli* enteropatógena. Un plásmido contiene la región genética de *espA* que codifica para la parte amino-terminal de EspA (necesaria para mediar la secreción de tipo III) fusionada a una secuencia del virus del herpes simple (VHS) que codifica para una etiqueta de secuencia frente a la que están disponibles anticuerpos comerciales. Este plásmido se transforma en una cepa que contiene una mutación de *espA* aunque todavía secreta las otras proteínas secretadas por *E. coli* enteropatógena que usan el sistema de secreción de tipo III. Se recoge el sobrenadante de los organismos que contienen estas fusiones, se añade a una placa para ELISA, seguido por un ELISA convencional. Una lectura calorimétrica indica que se secreta la proteína de fusión.
- 40 Este plásmido también se transforma en una cepa que es defectuosa para la secreción de tipo III (es decir, un control negativo). Cuando se expresa la proteína de fusión en esta cepa, se expresa la proteína de fusión pero no se secreta. Los resultados de ELISA con este mutante confirman que no se secreta.
- 45 Por tanto, se proporciona un ensayo de ELISA sencillo para examinar la secreción. Este ensayo es simple y no requiere una tecnología especial. También es económico, porque no se necesitan reactivos caros. Es automático y se usa para examinar reactivos para identificar inhibidores de la secreción bacteriana de tipo III.
- 50 Para someter a ensayo la secreción, se hacen crecer bacterias en reposo durante la noche en fluido de cultivo tisular en presencia de compuestos que van a someterse a prueba. Estas condiciones producen secreción mediada por *E. coli* enteropatógena. Al día siguiente, se retiran las bacterias mediante centrifugación, y se pone el sobrenadante en pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se realiza un ELISA convencional con los sobrenadantes. Si el compuesto que está sometiéndose a prueba es bactericida, las bacterias no crecen durante la noche.
- 55 Se fusiona un polinucleótido que codifica para otro polipéptido secretado por *E. coli* enteropatógena a varias moléculas bien conocidas. Se fusionó un polinucleótido que codifica para polipéptido EspB a una etiqueta de VHS, frente a la que están disponibles anticuerpos comerciales. La fusión génica todavía se secretaba a partir de *E. coli* enteropatógena. Este plásmido se transformó en una cepa que contenía una mutación de *espA* aunque todavía secreta las otras proteínas secretadas por *E. coli* enteropatógena que usan el sistema de secreción de tipo III. Se

5 recoge el sobrenadante de los organismos que contienen estas fusiones, se añade a una placa para ELISA, seguido por una tecnología de ELISA convencional con, por ejemplo, anticuerpos anti-VHS. Este examen se usó para someter a ensayo extractos vegetales procedentes de plantas importantes desde el punto de vista médico. Las diluciones de 1/200-1/1000 (aproximadamente 250 µg/ml) son apropiadas. Se vuelven a examinar compuestos prometedores en el ensayo de secreción de ELISA para comprobar la reproducibilidad.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a las realizaciones preferidas actualmente, debe entenderse que pueden realizarse diversas modificaciones sin apartarse del espíritu de la invención. Por consiguiente, la invención sólo está limitada por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Composición de vacuna que comprende:
 - (i) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la figura 1; o
 - 5 (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la figura 1.
2. Composición de vacuna según la reivindicación 1 que es para mejorar una enfermedad causada por un organismo productor de EspA.
3. Composición de vacuna según la reivindicación 1 ó 2, que es para inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a un organismo productor de EspA.
- 10 4. Uso de
 - (i) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la figura 1; o
 - (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la figura 1;para la preparación de una vacuna para mejorar una enfermedad causada por un organismo productor de EspA.
- 15 5. Composición de vacuna según la reivindicación 2 ó 3 o uso según la reivindicación 4, en la/el que el organismo productor de EspA es *E. coli*.
6. Composición de vacuna o uso según la reivindicación 5, en la/el que la *E. coli* productora de EspA es *E. coli* enteropatógena.
- 20 7. Composición de vacuna o uso según la reivindicación 5, en la/el que la *E. coli* productora de EspA es *E. coli* enterohemorrágica.

```

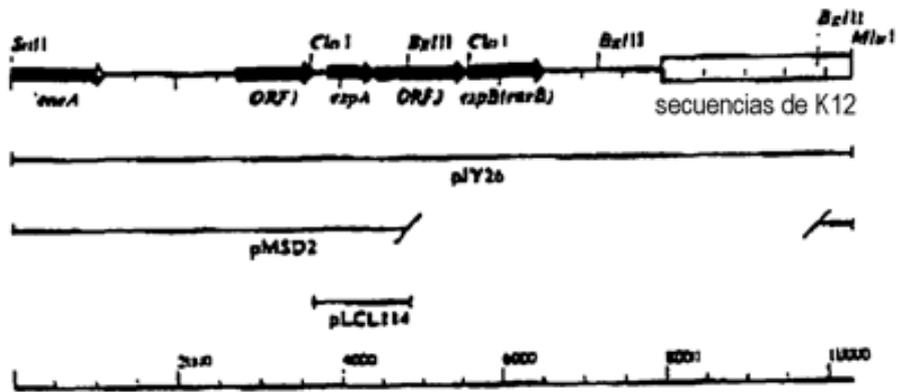
ttatagttttgtcatgctaagaagattatgaagaggtatatac ATG GAT ACA
                                                    M D T    3
TCA ACT ACA GCA TCA GTT GCT AGT GCG AAT GCG AGT ACT TCG ACA
S T T A S V A S A N A S T S T    18
TCA ATG GCC TAT GAT TTA GGG AGC ATG TCG AAA GAT GAC GTT ATT
S M A Y D L G S M S K D D V I    33
GAT CTA TTT AAT AAA CTC GGT GTT TTT CAG GCT GCA ATT CTC ATG
D L F N K L G V F Q A A I L M    48
TTT GCC TAT ATG TAT CAG GCA CAA AGC GAT CTG TCG ATT GCA AAG
F A Y M Y Q A Q S D L S I A K    63
TTT GCT GAT ATG AAT GAG GCA TCT AAG GAG TCA ACC ACT GCC CAA
F A D M N E A S K E S T T A Q    78
AAA ATG GCT AAT CTT GTA GAT GCT AAA ATT GCT GAC GTT CAG AGT
K M A N L V D A K I A D V Q S    93
AGC TCT GAC AAG AAT GCG AAA GCT CAA CTT CCT GAT GAA GTG ATT
S S D K N A K A Q L P D E V I    108
TCA TAT ATA AAT GAT CCT CGC AAT GAC ATT ACA ATA AGT GGT ATT
S Y I N D P R N D I T I S G I    123
GAC AAT ATA AAT GCT CAA TTA GGC GCT GGT GAT TTG CAA ACG GTG
D N I N A Q L G A G D L Q T V    138
AAA GCA GCT ATT TCA GCT AAA GCG AAT AAT TTG ACA ACG ACG GTC
K A A I S A K A N N L T T T V    153
AAT AAT AGC CAG CTT GAA ATA CAG CAA ATG TCA AAT ACG TTA AAC
N N S Q L E I Q Q M S N T L N    168
CTA TTA ACG AGT GCA CGT TCT GAT ATG CAG TCA CTG CAA TAT AGA
L L T S A R S D M Q S L Q Y R    183
ACT ATT TCA GGA ATA TCC CTT GGT AAA TAA ccggagataactATG
T I S G I S L G K *    198

```

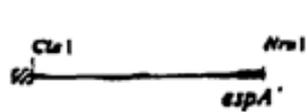
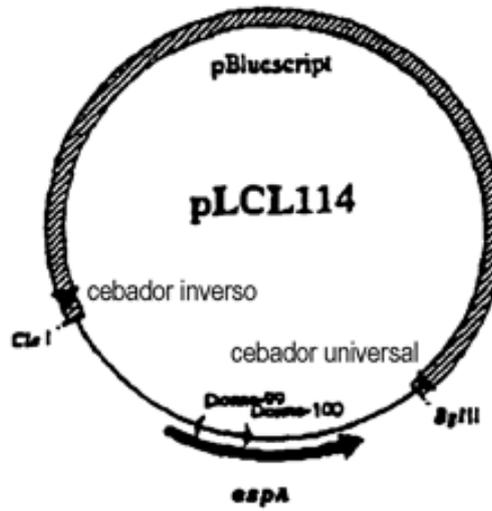
Fig. 1

FIGURA 2

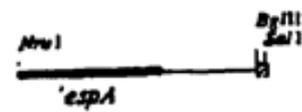
A



B



pLCL119



pLCL120

^{*Nru*I} ^{*Sma*I}
^{*Cla*I} CCT TCC GGC TCA CTAACTAAACTACCGAATTA ATC *espA*-J TAG TACCTGGAGGATA ATG ACC CCG ACG ^{*Bgl*II} ^{*Sma*I} ^{*Nru*I}

FIGURA 3

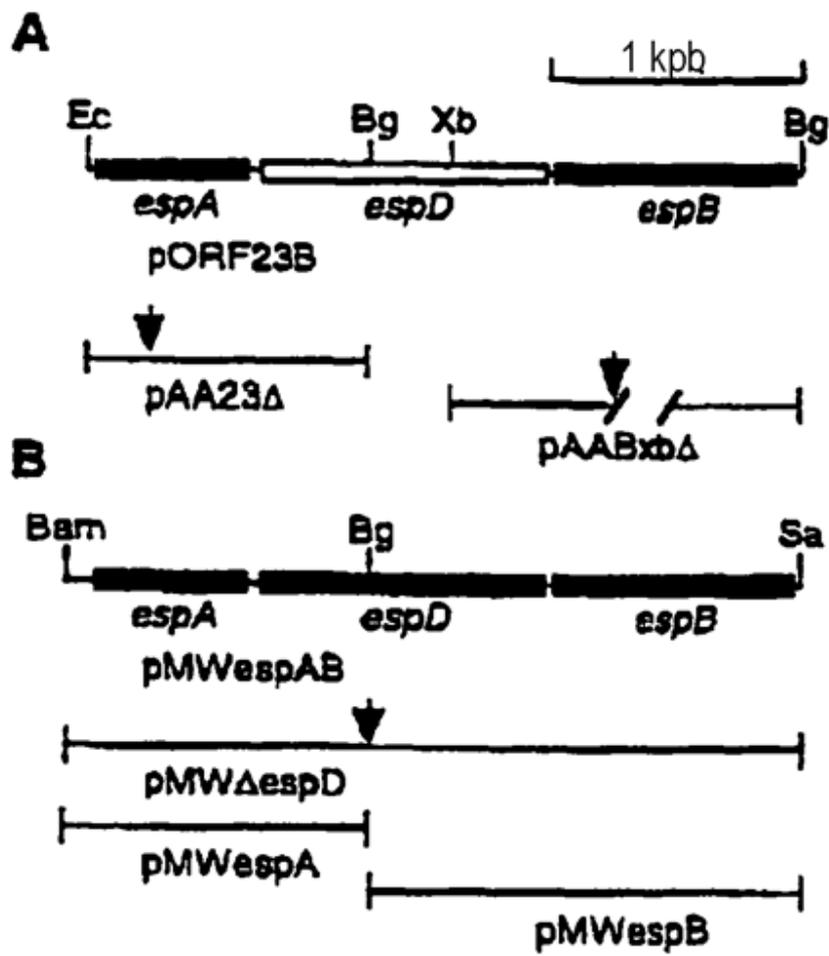


FIGURA 4A

A

tcaatgatcggtaaaagtaattgattataaaggaggatgctcatttgatattgggtcttttaaat 60
 cgttcttgggtcttggctaagaaagattattaaggggtatataacATGGATACATCAACTGCA 120
 M D T S T A

ACATCAGTTGCTAGTGGAAACGGAGTACTTCGACATOGACAGTCTATGACTTAGCCAGT 180
 T S V A S A N A S T S T S T V Y D L G S

ATGTGAAAGACGAAGTAGTTGAGCTATTTAATAAACTCGGTGTTTTTCAGGCTGCGCTT 240
 M S K D E V V Q L F N K V G V F Q A A L

CTCATGTTGCTTATATGTATCAGGCACAAAGCGATCTCTCGAATGCAAAAGTTTGGCTGAT 300
 L M F A Y M Y Q A Q S D L S I A K F A D

ATGAATGAGGCATCTAAGGAGTCACCCACAGCCCAAAAATGGCTAATCTTGTGGATGCT 360
 N N E A S K E S T T A Q K M A N L V D A

AAATTTGCTGATGTTGAGAGTAGTTCTGACAAGAATAAGAAAGCCAACTTCTCTCAAGAA 420
 K I A D V Q S S S D R N K K A K L P Q E

GTGATTGACTATATAAAATGATCCTTCGCAATGACATTACAGTAAGTGGTATTAGCGATCIA 480
 V I D Y I N D P R N D I T V S G I S D L

AATGCTGAATTAGCGGCTGGTGATTTGCAAACGGTGAAGGCGGCTATTTGGGCCAAATCG 540
 N A E L G A G D L Q T V K A A I S A K S

AATACTTGACCACGGTAGTGAATAATAGCCAGCTTGAAATACAGCAATGTCAATACG 600
 N N L T T V V N N S Q L E I Q Q M S N T

TTAAACCTATTAAAGAGTGCACGTTCTGATATTCAGTCACTGCAATACAGAACTATTCA 660
 L N L L T S A R S D I Q S L Q Y R T I S

GCAATATCCCTTGSTAAATAAccggagataaactATGCTTAATGTAATAGCGATATCCAG 720
 A I S L G K * H L N V N S D I Q

TCTATG 726
 S M

