

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 984**

51 Int. Cl.:

A61K 39/108 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2002 E 02726978 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1349570**

54 Título: **Vacuna contra Escherichia coli enterohemorrágica**

30 Prioridad:

04.01.2001 US 259818 P

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

11.03.2014

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN (50.0%)
120 Veterinary Road
Saskatoon Saskatchewan S7N 5E3, CA y
THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (50.0%)

72 Inventor/es:

FINLAY, BRETT y
POTTER, ANDREW A.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 446 984 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 contra *Escherichia coli* enterohemorrágica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para provocar una respuesta inmunitaria en mamíferos contra *Escherichia coli* enterohemorrágica. En particular, la invención se refiere al uso de sobrenadantes de cultivo celular para el tratamiento y la prevención de la colonización de mamíferos por *E. coli* enterohemorrágica.

10

Antecedentes de la invención

Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH), también denominada *E. coli* productora de toxina Shiga (ECTS) y *E. coli* vertotoxigénica (ECVT) son bacterias patógenas que producen diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, insuficiencia renal y muerte en seres humanos. Mientras que muchas cepas de ECEH productoras de toxinas similares a Shiga pueden producir enfermedades en seres humanos, las del serotipo O157:H7 producen la mayoría de las enfermedades humanas. Este organismo puede colonizar el intestino grueso de seres humanos mediante un mecanismo único en el que un número de determinantes de virulencia se administran a las células huésped a través de un sistema de secreción de tipo III, incluyendo el receptor de intimina translocado, Tir (DeVinney et al., *Infect. Immun.* (1999) 67:2389). En particular, estos patógenos secretan determinantes de virulencia EspA, EspB y EspD que permiten la administración de Tir en las membranas de células intestinales. Tir se integra en la membrana de la célula huésped donde sirve como el receptor para una proteína de la membrana externa bacteriana, intimina. La unión Tir-intimina une ECEH a la superficie de células intestinales y desencadena reorganizaciones en el citoesqueleto de actina debajo de la ECEH adherente lo que produce la formación de un pedestal. EspA, EspB, Tir e intimina son cada una esencial para la colonización con éxito del intestino por ECEH.

Aunque ECEH coloniza el intestino de rumiantes y otros mamíferos, generalmente no producen enfermedad sintomática en estos animales. Sin embargo, la contaminación de la carne y el agua por el serotipo O157:H7 de ECEH (de aquí en adelante, "ECEH O157:H7") es responsable de aproximadamente 50.000 casos de infección por ECEH O157:H7 en seres humanos al año en los Estados Unidos y Canadá lo que produce aproximadamente 500 muertes. En 1994, el coste económico asociado con la infección por ECEH O157:H7 en seres humanos se estimó que estaba por encima de 5 mil millones de dólares anuales.

El primer brote de ECEH O157:H7 documentado localizado a carne contaminada se produjo en 1982. Posteriormente, se demostró que los rumiantes saludables incluyendo, pero no limitados a, ganado vacuno, vacas lecheras y ovejas, podrían estar infectados con ECEH O157:H7. De hecho, informes de la USDA indican que hasta el 50% del ganado vacuno son portadores de ECEH O157:H7 en algún momento durante su vida y, por tanto, excretan ECEH O157:H7 en sus heces.

Debido al procesamiento mayoritario de ganado vacuno sacrificado y el bajo número de ECEH O157:H7 (10-100) necesario para infectar a un ser humano, la colonización por ECEH O157:H7 de ganado vacuno sano permanece como un problema de salud serio. Para abordar este problema, la investigación se ha enfocado en métodos mejorados para detectar y posteriormente aniquilar ECEH O157:H7 en el momento del sacrificio, alterar la dieta del ganado vacuno para reducir el número de ECEH O157:H7 intestinal e inmunizar animales para prevenir la colonización por ECEH O157:H7 (Zacek D. *Animal Health and Veterinary Vaccines*, Alberta Research Counsel, Edmonton, Canadá, 1997). Recientemente, se han descrito la producción y el uso recombinante de proteínas de ECEH O157:H7 incluyendo EspA recombinante (Publicación International No. WO 97/40063), TIR recombinante (Publicación International No. WO 99/24576), EspB recombinante e intimina recombinante (Li et al., *Infec. Immun.* (2000) 68:5090-5095). Sin embargo, la producción y purificación de proteínas recombinantes en cantidades suficientes para su uso como antígenos es tanto difícil como cara. En el momento actual, no hay método eficaz para bloquear la colonización por ECEH O157:H7 de ganado vacuno y otros mamíferos y, por tanto, para reducir la excreción de ECEH en el medio ambiente.

Por tanto, existe una necesidad para composiciones y métodos nuevos para el tratamiento y la prevención de la enfermedad de ECEH, así como para reducir la colonización por ECEH de mamíferos para reducir la incidencia de problemas de salud asociados con carne y agua contaminados por ECEH.

Compendio de la invención

La presente invención satisface la necesidad anterior proporcionando tales composiciones para su uso en tales métodos. En particular, los métodos descritos en el presente documento hacen uso de una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de un sobrenadante de cultivo celular concentrado de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), en donde el sobrenadante de cultivo celular, hecho crecer en medio mínimo M9 suplementado con NaHCO₃ 20-100 mM, MgSO₄ 5-10 mM, glucosa del 0,1-1,5% y casaminoácidos del 0,05-0,5%, comprende un antígeno secretado por un sistema de secreción de tipo III y es capaz de estimular una respuesta inmunitaria contra ECEH, y un adyuvante inmunológico, tratándose y/o previniéndose con ello la infección por ECEH

- 5 y/o reduciéndose la colonización por ECEH del mamífero. Las composiciones se administran con un adyuvante coadministrado. En ciertas formas de realización, EspA y Tir comprenden al menos el 20% de la proteína del sobrenadante de cultivo celular. El sobrenadante del cultivo de ECEH puede derivar de cualquier serotipo de ECEH, pero preferiblemente se obtiene de un cultivo de ECEH O157, tal como ECEH O157:H7 o ECEH:NM (no móvil). El sobrenadante del cultivo celular de la presente invención es fácil y relativamente barato de preparar y es eficaz a pautas de dosis que tienen toxicidad mínima.
- 10 EspA, EspB, Tir e intimina son necesarios para la activación (A) de rutas de transducción de señales de células epiteliales huéspedes y para la unión estrecha (E) de ECEH a las células huéspedes epiteliales. Por tanto, sin estar unido a la siguiente hipótesis, se cree que la administración del SCC de la presente invención a un mamífero estimula una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos secretados, tal como EspA y Tir, que bloquea la unión de ECEH a las células epiteliales intestinales.
- 15 Según esto, es un objeto de la presente invención proporcionar una vacuna eficaz para estimular una respuesta inmunitaria contra antígenos secretados de ECEH, tratando y/o previniendo con ello la enfermedad por ECEH en un mamífero.
- 20 Otro objeto es proporcionar una vacuna eficaz para reducir, prevenir y/o eliminar la colonización por ECEH de un rumiante u otro mamífero.
- Otro objeto es reducir el número de animales que excretan ECEH en el medio ambiente.
- Otro objeto es reducir el número de ECEH excretada en el medio ambiente por un animal infectado.
- 25 Otro objeto es reducir el tiempo durante el cual ECEH se excreta en el medio ambiente por un animal infectado.
- En el presente documento se describe la reducción de la contaminación por ECEH del medio ambiente.
- 30 En el presente documento se describe la reducción de la contaminación por ECEH de carne y/o agua.
- En el presente documento se describe el tratamiento, prevención o reducción de infecciones por ECEH en seres humanos.
- 35 En el presente documento se describen vacunas eficaces como un auxiliar a otros agentes biológicos anti-ECEH.
- En el presente documento se describen vacunas eficaces como un auxiliar a agentes químicos anti-ECEH.
- 40 En el presente documento se describen vacunas eficaces como un auxiliar a agentes anti-ECEH biológicamente manipulados.
- Otro objeto es proporcionar una vacuna eficaz como un auxiliar para agentes anti-ECEH basados en ácidos nucleicos.
- 45 Otro objeto es proporcionar una vacuna eficaz como un auxiliar para agentes anti-ECEH proteínas recombinantes.
- Otro objeto es proporcionar un plan de vacunación eficaz para reducir la colonización por ECEH de un rumiante.
- Otro objeto es proporcionar un plan de vacunación eficaz para reducir la excreción de ECEH por un rumiante.
- 50 Otro objeto es proporcionar una vacuna eficaz para reducir la colonización por ECEH O157 de ganado vacuno, tal como la colonización de ECEH O157:H7 y/o ECEH:NM.
- Otro objeto es proporcionar una vacuna eficaz para prevenir la colonización por ECEH O157 de ganado vacuno, tal como la colonización de ECEH O157:H7 y/o ECEH:NM.
- 55 Otro objeto es proporcionar una vacuna eficaz para eliminar la colonización por ECEH O157:H7 de ganado vacuno, tal como la colonización de ECEH O157:H7 y/o ECEH:NM.
- Otro objeto es reducir el número de ganado vacuno que excreta ECEH O157 en el medio ambiente, tal como la excreción de ECEH O157:H7 y/o ECEH:NM.
- 60 Otro objeto es reducir el número ECEH O157 excretada en el medio ambiente por ganado vacuno infectado, tal como la excreción de ECEH O157:H7 y/o ECEH:NM.
- 65 Otro objeto es reducir el tiempo durante el cual ECEH O157 se excreta en el medio ambiente por ganado vacuno infectado, tal como la excreción de ECEH O157:H7 y/o ECEH:NM.

Otro objeto es proporcionar una vacuna eficaz como un auxiliar a otros agentes anti-ECEH O157.

5 Otro objeto es proporcionar un plan de vacunación eficaz para reducir la colonización de ganado vacuno por ECEH O157.

Otro objeto es proporcionar un plan de vacunación eficaz para reducir la excreción de ECEH O157 por ganado vacuno.

10 Por tanto, en una forma de realización, la invención se dirige a una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de un sobrenadante de cultivo celular de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) concentrado, en donde el sobrenadante de cultivo celular, hecho crecer en medio mínimo M9 suplementado con NaHCO₃ 20-100 mM, MgSO₄ 5-10 mM, glucosa del 0,1-1,5% y casaminoácidos del 0,05-0,5%, comprende un antígeno secretado por un sistema de secreción de tipo III y es capaz de estimular una respuesta inmunitaria contra ECEH, y un adyuvante inmunológico. En ciertas formas de realización, la ECEH es ECEH O157:H7 y/o ECEH O157:NM. En formas de realización adicionales, el adyuvante inmunológico comprende una emulsión de aceite en agua, tal como aceite de aceite mineral y bromuro de dimetildioctadecilamonio. En formas de realización aun adicionales, el adyuvante inmunológico es VSA3. El VSA3 puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 40% (v/v), tal como a una concentración del 30% (v/v).

20 En aun otras formas de realización, la composición de vacuna comprende además uno o más antígenos secretados de ECEH recombinantes o purificados seleccionados del grupo que consiste en EspA, EspB, EspD y Tir. En otras formas de realización, EspA + Tir comprende al menos al 20% de la proteína celular presente en la composición.

25 En el presente documento se describen métodos para provocar una respuesta inmunológica en un mamífero contra un antígeno secretado de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). El método comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un sobrenadante de cultivo celular de ECEH. En ciertas formas de realización, la ECEH es ECEH O157:H7 y/o ECEH O157:NM. En formas de realización adicionales, el mamífero es un ser humano o un rumiante, tal como un sujeto bovino. En aún otras formas de realización, la composición comprende además un adyuvante inmunológico, tal como una emulsión de aceite en agua, que comprende por ejemplo, un aceite de aceite mineral y bromuro de dimetildioctadecilamonio. En formas de realización adicionales, el adyuvante es VSA3. Las composiciones pueden comprender además uno o más antígenos secretados de ECEH recombinantes o purificados seleccionados del grupo que consiste en EspA, EspB, EspD y Tir. En otras formas de realización, EspA + Tir comprende al menos al 20% de la proteína celular presente en la composición.

40 También se describe en el presente documento un método para provocar una respuesta inmunológica en un rumiante contra un antígeno secretado de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 (ECEH O157:H7). El método comprende administrar al rumiante una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un sobrenadante de cultivo celular de ECEH O157:H7 y VSA3. En formas de realización adicionales, VSA3 está presente en la composición a una concentración desde aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 40% (v/v), tal como a aproximadamente el 30% (v/v).

45 También se describe en el presente documento un método para reducir la colonización de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) en un rumiante que comprende administrar al rumiante una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un sobrenadante de cultivo celular de ECEH y un adyuvante inmunológico.

50 También se describe en el presente documento un método para reducir la excreción de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) de un rumiante que comprende administrar al rumiante una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un sobrenadante de cultivo celular de ECEH y un adyuvante inmunológico.

55 Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y las figuras adjuntas. Además, se muestran varias referencias en el presente documento que describen en más detalle ciertos procedimientos o composiciones.

Breve descripción de las figuras

60 La figura 1 muestra el perfil electroforético de las proteínas de SCC separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

La figura 2 muestra el perfil electroforético de EspA, Tir, EspB e intimina recombinantes separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

65

La figura 3 muestra la excreción fecal de ECEH O157:H7 por ganado vacuno inmunizado con una vacuna de SCC después de exposición a ECEH O157:H7.

5 La figura 4 representa la reactivación de la excreción fecal de ECEH O157:H7 en ganado vacuno previamente infectado.

La figura 5 muestra la respuesta serológica a la inmunización con vacuna de EspA + Tir recombinantes y con vacuna de EspB + intimina recombinantes.

10 La figura 6 muestra la excreción fecal de ECEH O157:H7 después de la inmunización con vacuna de EspA + Tir recombinantes y con vacuna de solución salina.

15 La figura 7 muestra el número de animales que excretan *E. coli* O157:H7 en cada día del ensayo de vacuna descrito en el ejemplo 6. Las bacterias se detectaron por siembra directa de las muestras fecales que se habían resuspendido en solución salina en agar MaConkey con sorbitol suplementado con cefixima y telurita. Barras sólidas, grupo de placebo; barras entramadas, grupo de vacuna contra ECEH.

20 La figura 8 muestra un análisis por inmunotransferencia de sueros de animales vacunados contra proteínas secretadas de ECEH. Cada transferencia contiene proteínas secretadas de *E. coli* de tipo salvaje O157:H7 (ECEH), mutante de secreción de tipo III (Δ SepB), mutante *tir* (Δ Tir) y una proteína de fusión glutatión-S-transferasa:Tir purificada (GST-Tir). Las proteínas se separaron por SDS- PAGE al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie (A, panel izquierdo superior) o se transfirieron a nitrocelulosa y se ensayaron con sueros representativos de animales que recibieron 3 inmunizaciones con cada formulación de vacuna (A, paneles superiores). Los cuatro paneles inferiores (B) se ensayaron con sueros de un animal representativo que recibió la vacuna contra ECEH, tomados los días 0, 21, 25 y 49 del ensayo.

30 La figura 9 muestra el porcentaje de cada grupo de animales que excretan *E. coli* O157:H7 (panel A) y el número total de bacterias recuperadas (panel B) cada día del ensayo descrito en el ejemplo 6. Las bacterias se detectaron en heces sembrando en agar MaConkey con sorbitol suplementado con cefixima y telurita después del enriquecimiento inmunomagnético como se describe en J. Van Donkersgoed et al., *Can. Vet. J.* (2001) 42:714. (A) barras sólidas, placebo; barras entramadas, vacuna contra ECEH; barras abiertas, vacuna Δ Tir. (B) ■, grupo de placebo; ●, vacuna contra ECEH; ▲, vacuna contra Δ Tir.

35 Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de las habilidades de la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II y III, Segunda Edición (1989); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); la serie, *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); y *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

45 A. Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica a continuación.

50 Se debe indicar que, como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contenido claramente imponga otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una bacteria ECEH” incluye una mezcla de dos o más de tales bacterias, y similares.

60 Como se usa en el presente documento, el término “sobrenadante de cultivo celular” o “SCC” de ECEH se refiere a un sobrenadante derivado de un cultivo celular de uno o más serotipos de ECEH, sobrenadante que está sustancialmente libre de células bacterianas de ECEH o el lisado de tales células, y que contiene un mezcla de antígenos de ECEH que se han secretado al medio de cultivo. Generalmente, un “SCC” de ECEH contendrá al menos los antígenos secretados EspA, EspB, EspD y Tir, y fragmentos o agregados de los mismos. El SCC de la presente invención también puede incluir otras proteínas secretadas, tales como EspF y MAP, y una o ambas toxinas Shiga 1 y 2, así como EspP que es una proteína de aproximadamente 100 kDa que no se secreta por el sistema de tipo III. Las proteínas pueden estar presentes en forma nativa, o en una forma desnaturalizada o degradada, siempre que el SCC aun funcione para estimular una respuesta inmunitaria en el sujeto huésped de modo que la enfermedad de ECEH se reduzca o prevenga, y/o la colonización por ECEH se reduzca o suprima. En algunos casos, se puede suplementar un SCC con antígenos secretados recombinantes o purificados adicionales, tal como con EspA, EspB, EspD y/o Tir adicionales, así como con cualquiera de las otras proteínas secretadas, y también se puede suplementar con intimina. En ciertas formas de realización, EspA + Tir comprenderá al menos el 20% de la proteína del sobrenadante de cultivo celular.

Como se usa en el presente documento, una proteína secretada de ECEH "recombinante", tal como rEspA, rEspB, rEspD y rTir, así como la "intimina recombinante", se refiere a la secuencia polipeptídica de longitud completa, fragmentos de la secuencia de referencia o sustituciones, deleciones y/o adiciones a la secuencia de referencia, siempre que la proteína retenga al menos un epítipo o actividad específicos. Generalmente, los análogos de la secuencia de referencia mostrarán al menos aproximadamente el 50% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos aproximadamente del 75% al 85% de identidad de secuencia, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente del 90% al 95% o más de identidad de secuencia, respecto a la secuencia de referencia de longitud completa. Véase, por ejemplo, los Nos. de acceso de GenBank AE005594, AE005595, AP002566, AE005174, NC_002695, NC_002655 para la secuencia completa del genoma de *E. coli* O157:H7, que incluye las secuencias de varias proteínas secretadas de O157:H7. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional No. WO 97/40063, así como los Nos. de acceso de GenBank Y13068, U80908, U5681, Z54352, AJ225021, AJ225020, AJ225019, AJ225018, AJ225017, AJ225016, AJ225015, AF022236 y AF200363 para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de EspA de un número de serotipos de *E. coli*. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional No. WO 99/24576, así como los Nos. de acceso de GenBank AF125993, AF132728, AF045568, AF022236, AF70067, AF070068, AF013122, AF200363, AF113597, AF070069, AB036053, AB026719, U5904 y U59502, para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de Tir de un número de serotipos de *E. coli*. Véase, por ejemplo, los Nos. de acceso de GenBank U32312, U38618, U59503, U66102, AF081183, AF081182, AF130315, AF339751, AJ308551, AF301015, AF329681, AF319597, AJ275089-AJ275113 para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de intimina de un número de serotipos de *E. coli*. Véase, por ejemplo, los números de acceso de GenBank U80796, U65681, Y13068, Y13859, X96953, X99670, X96953, Z21555, AF254454, AF254455, AF254456, AF254457, AF054421, AF059713, AF144008, AF144009 para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de EspB de un número de serotipos de *E. coli*. Véase, por ejemplo, los Nos. de acceso de GenBank Y13068, Y13859, Y17875, Y17874, Y09228, U65681, AF054421 y AF064683, para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de EspD de un número de serotipos de *E. coli*.

"Homología" se refiere al porcentaje de similitud entre dos polinucleótidos o dos fracciones polipeptídicas. Dos ADN, o dos secuencias polipeptídicas, son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente el 80%-85%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%-98% de similitud de secuencia a lo largo de una longitud definida de las moléculas. Como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogos también se refiere a secuencias que muestran identidad completa al ADN o secuencia de polipéptido especificado.

El porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar por una comparación directa de la información de secuencia entre dos secuencias alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta, y multiplicando el resultado por 100. Se pueden usar programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en *Atlas of Protein Sequence and Structure* M.O. Dayhoff ed., 5 Supl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Advances in Appl. Math.* 2:482-489 para análisis de péptidos. Programas para determinar la identidad de secuencia de nucleótidos están disponibles en el paquete Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package al que se ha hecho referencia anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia particular de nucleótidos respecto a una secuencia de referencia se puede determinar usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Alternativamente, la homología se puede determinar por hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s) de regiones monocatenarias, y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas se pueden identificar en un experimento de hibridación Southern en, por ejemplo, condiciones rigurosas, definidas para ese sistema particular. Definir las condiciones de hibridación apropiadas está dentro de las capacidades de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., anteriormente; *DNA Cloning*, anteriormente; *Nucleic Acid Hybridization*, anteriormente.

Como se usa en el presente documento, "vacuna" se refiere a una composición de SCC que sirve para estimular una respuesta inmunitaria a un antígeno de ECEH, tal como un antígeno de ECEH secretado de tipo III, en el mismo. La respuesta inmunitaria no necesita proporcionar protección y/o tratamiento completo contra la infección por ECEH o contra la colonización y excreción de ECEH. Incluso una protección parcial contra la colonización y excreción de las bacterias ECEH encontrarán uso en el presente documento ya que la excreción y la producción de carne contaminada todavía se reducirán. En algunos casos, una vacuna incluirá un adyuvante inmunológico para aumentar la respuesta inmunitaria. El término "adyuvante" se refiere a un agente que actúa de una manera no específica para aumentar una respuesta inmunitaria a un antígeno particular o combinación de antígenos, reduciendo de esta manera la cantidad de antígeno necesaria para cualquier vacuna determinada, y/o la frecuencia de inyección

necesaria para generar una respuesta inmunitaria adecuada hacia el antígeno de interés. Véase, por ejemplo, A.C. Allison *J. Reticuloendothel. Soc.* (1979) 26:619-630. Tales adyuvantes se describen posteriormente.

5 Como se usa en el presente documento, “colonización” se refiere a la presencia de ECEH en el tracto intestinal de un mamífero, tal como un rumiante.

Como se usa en el presente documento, “excreción” se refiere a la presencia de ECEH en heces.

10 Como se usa en el presente documento, “cantidad terapéutica”, “cantidad eficaz” y “cantidad eficaz para” se refiere a una cantidad de vacuna eficaz para provocar una respuesta inmunitaria contra un antígeno secretado presente en el SCC, reduciendo o previniendo con ello la enfermedad de ECEH, y/o la colonización por ECEH de un mamífero tal como un rumiante; y/o reduciendo el número de animales que excretan ECEH; y/o reduciendo el número de ECEH excretadas por un animal; y/o reduciendo el periodo de tiempo de excreción de ECEH por un animal.

15 Como se usa en el presente documento, “inmunización” o “inmunizar” se refiere a la administración de SCC, con o sin antígenos de ECEH recombinantes o purificados adicionales tales como EspA, Tir, EspB, EspD y/o intimina, en una cantidad eficaz para estimular el sistema inmunitario del animal al que se administra el SCC, para provocar una respuesta inmunológica contra uno o más de los antígenos secretados presentes en el SCC.

20 El término “epítipo” se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al que responden células B y/o células T específicas. El término también se usa de forma intercambiable con “determinante antigénico” o “sitio determinante antigénico”.

25 Una “respuesta inmunológica” hacia una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos hacia la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una “respuesta inmunológica” incluye, pero no está limitada a uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras y/o células T citotóxicas y/o células T $\gamma\delta$, dirigida específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped mostrará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de modo que la enfermedad de ECEH se reduzca y/o prevenga; se otorgue resistencia del intestino a la colonización con ECEH; el número de animales que excretan ECEH se reduce; el número de ECEH excretada por un animal se reduce; y/o el periodo de tiempo de la excreción de ECEH por un animal se reduce.

35 Los términos proteína o polipéptido “inmunogénico” se refieren a una secuencia de aminoácidos que provoca una respuesta inmunológica como se ha descrito anteriormente. Una proteína o polipéptido “inmunogénico”, como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína de ECEH particular en cuestión, análogos de la misma, agregados o fragmentos inmunogénicos de la misma. Mediante “fragmento inmunogénico” se quiere decir un fragmento de una proteína de ECEH secretada que incluye uno o más epítipos y por tanto provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos se pueden identificar usando cualquier número de métodos de mapeo de epítipos, bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols* en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítipos lineales se pueden determinar, por ejemplo, sintetizando al mismo tiempo grandes números de péptidos en soportes sólidos, los péptidos correspondientes a partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos están aun unidos a los soportes. Tales métodos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente en EE UU No. 4.708.871; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. De forma similar, los epítipos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de los aminoácidos, tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, *Epitope Mapping Protocols*, anteriormente. También se pueden identificar regiones antigénicas de proteínas usando gráficos estándar de antigenicidad e hidropatía, tales como los calculados usando, por ejemplo, el programa de software Omiga versión 1.0 disponible del Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el método de Hopp/Woods, Hopp et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 78:3824-3828 para determinar perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte et al., *J. Mol. Biol.* (1982) 157:105-132 para gráficos de hidropatía.

55 Los fragmentos inmunogénicos, para los fines de la presente invención, habitualmente incluirán al menos aproximadamente 3 aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 5 aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 10-15 aminoácidos, y lo más preferiblemente 25 o más aminoácidos, de la molécula de proteína secretada de ECEH parental. No hay límite superior crítico respecto a la longitud del fragmento, que puede comprender casi la longitud completa de la secuencia de la proteína, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más epítipos de la proteína secretada de ECEH particular.

60 Proteínas o polipéptidos “nativos” se refiere a proteínas o polipéptidos aislados de la fuente en la que la proteína se produce de forma natural. Polipéptidos “recombinantes” se refiere a polipéptidos producidos por técnicas de ADN recombinante; es decir, producidas de células transformadas por una construcción de ADN exógena que codifica el polipéptido deseado. Polipéptidos “sintéticos” son los preparados por síntesis química.

65

El término “tratamiento” como se usa en el presente documento se refiere o bien a (i) la prevención de infección o reinfección (profilaxis), o (ii) la reducción o eliminación de síntomas de la enfermedad de interés (terapia).

Mediante “sujeto mamífero” se quiere decir cualquier miembro de la clase Mammalia, incluyendo seres humanos y todos los otros animales que poseen glándulas mamarias (tanto machos como hembras), tales como rumiantes, incluyendo, pero no limitados a, especies bovinas, porcinas y *Ovis* (ovejas y cabras). El término no indica una edad particular. Por tanto, se pretenden que estén cubiertos adultos, recién nacidos y fetos.

B. Métodos generales

Central para la presente invención es el descubrimiento de que sobrenadantes de cultivos celulares derivados de cultivos de ECEH que contienen antígenos secretados de ECEH producen una respuesta inmunitaria en animales a los que se les administran y mediante ello proporcionan protección contra la infección por ECEH, tal como protección contra la colonización. En ciertas formas de realización, las composiciones comprenden una mezcla de antígenos secretados de ECEH, incluyendo pero no limitados a EspA, EspB, EspD y/o Tir. El SCC de la presente invención también puede incluir otras proteínas secretadas, tales como EspF y MAP, una o ambas toxinas Shiga 1 y 2, así como EspP que es una proteína de aproximadamente 100 kDa que no se secreta por el sistema de tipo III. En otras formas de realización, el SCC se suplementa con antígenos de ECEH recombinantes o purificados adicionales, tales como con EspA, EspB, EspD, Tir, intimina adicionales, y similares. En ciertas formas de realización, EspA + Tir comprende al menos el 20% de la proteína de sobrenadante de cultivo celular. Las composiciones pueden comprender sobrenadantes de cultivo celular y adyuvantes adicionales de más de un serotipo de ECEH para proporcionar protección contra múltiples organismos de ECEH. Además, se puede administrar un adyuvante farmacéuticamente aceptable con el sobrenadante de cultivo celular. Las composiciones se administran en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria hacia uno o más antígenos secretados, reduciendo o eliminando con ello la infección por ECEH. En algunos casos, la colonización por ECEH del animal se reduce o elimina. En formas de realización preferidas, el animal es una vaca o una oveja u otro rumiante. En formas de realización particularmente preferidas, el sobrenadante de cultivo celular deriva de un cultivo celular de ECEH O157:H7 o ECEH O157:NM.

La inmunización con el SCC estimula el sistema inmunitario del animal inmunizado para producir anticuerpos contra uno o más antígenos de ECEH secretados, tales como EspA, EspB, EspD y Tir, que bloquean la unión de ECEH a las células epiteliales intestinales, interfiere con la colonización de ECEH, y por tanto reduce la excreción de ECEH por el animal. Esta reducción en la excreción de ECEH produce una reducción en la contaminación por ECEH de alimentos y agua y una reducción en la enfermedad causada por ECEH en seres humanos. Además, la inesperada y sorprendente capacidad de la inmunización con SCC para prevenir, reducir y eliminar la colonización y excreción de ECEH por ganado vacuno aborda una necesidad largamente incumplida en la artes médicas, y proporciona un beneficio importante para seres humanos.

Además, el SCC de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir las infecciones por ECEH en otros mamíferos tal como los seres humanos. Si se usa en animales, el SCC se puede producir de una ECEH mutada que se ha manipulado para suprimir una o ambas de las toxinas Shiga 1 y 2 para reducir la toxicidad.

Como se ha explicado anteriormente, la eficacia terapéutica del SCC se puede aumentar añadiendo al mismo uno o más antígenos secretados en forma recombinante o purificada, tal como añadiendo EspA, EspB, EspD, Tir recombinante o purificado, y similares, fragmentos de los mismos y/o análogos de los mismos. También se puede añadir intimina. Otros métodos para aumentar la eficacia terapéutica del SCC incluyen, pero no están limitados a, formar complejos del SCC con soportes naturales o sintéticos y administrar el SCC antes, al mismo tiempo que, o después de otro agente anti-ECEH. Tales agentes incluyen, pero no están limitados a, agentes anti-ECEH biológicos, biológicamente manipulados, químicos, basados en ácidos nucleicos y de proteínas recombinantes.

También se puede usar SCC de bacterias patógenas, diferentes de serotipos de ECEH, que requieren proteínas tales como EspA y Tir para colonizar un huésped, para estimular el sistema inmunitario de un animal para producir anticuerpos contra antígenos de ECEH secretados que reducen la unión bacteriana a las células epiteliales intestinales del animal. Estas especies bacterianas incluyen, pero no están limitadas a *Citrotobacter rodentium*.

El SCC para uso en el presente documento se puede obtener de cultivos de cualquier serotipo de ECEH incluyendo, sin limitación serotipos de ECEH de los serogrupos O157, O158, O5, O8, O18, O26, O45, O48, O52, O55, O75, O76, O78, O84, O91, O103, O104, O111, O113, O114, O116, O118, O119, O121, O125, O28, O145, O146, O163, O165. Tales serotipos de ECEH se obtienen fácilmente de sueros de animales infectados. Los métodos para ECEH aislada se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Elder et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97:2999; Van Donkersgoed et al., *Can. Vet. J.* (1999) 40:332; Van Donkersgoed et al., *Can. Vet. J.* (2001) 42:714. Generalmente, tales métodos suponen sembrar directamente en agar MacConkey con sorbitol suplementado con cefixima y telurita o enriquecimiento inmunomagnético seguido por siembra en el mismo medio. Además, el SCC se puede obtener de serotipos de ECEH que se han manipulado genéticamente para suprimir la expresión de las toxinas Shiga 1 y/o 2, para reducir la toxicidad.

Generalmente, el SCC se produce cultivando bacterias ECEH en un medio adecuado, en condiciones que favorecen la secreción de antígenos de tipo III. Los medios y las condiciones adecuados para cultivar bacterias ECEH se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, las patentes en EE UU Nos. 6.136.554 y 6.165.743, así como en Li et al., *Infect. Immun.* (2000) 68:5090-5095; Fey et al., *Emerg. Infect. Dis.* (2000) Volumen 6. Un método particularmente preferible de obtener el SCC es hacer crecer primero los organismos en medio de Luria-Bertani (LB) durante un periodo de aproximadamente 8 a 48 horas, preferiblemente aproximadamente de 12 a 24 horas, y diluir este cultivo aproximadamente de 1:5 a 1:50, preferiblemente de 1:5 a 1:25, más preferiblemente aproximadamente 1:10, en medio mínimo M-9 suplementado con NaHCO₂ 20-100 mM, preferiblemente 30-50 mM, lo más preferiblemente NaHCO₃ aproximadamente 44 mM, MgSO₄ 4-20 mM, preferiblemente 5-10 y lo más preferiblemente MgSO₄ aproximadamente 8 mM, glucosa del 0,1 al 1,5%, preferiblemente del 0,2 al 1%, lo más preferiblemente glucosa al 0,4% y casaminoácidos del 0,05 al 0,5%, preferiblemente del 0,07 al 0,2%, lo más preferiblemente casaminoácidos aproximadamente al 0,1%. Los cultivos generalmente se mantienen a aproximadamente 37 grados C en CO₂ al 2-10%, preferiblemente CO₂ aproximadamente al 5%, hasta una densidad óptica a aproximadamente 600 nm de 0,7 a 0,8. Las células enteras se eliminan después mediante centrifugación y el sobrenadante se puede concentrar, por ejemplo 10-1000 veces o más, tal como 100 veces, usando diálisis, ultrafiltración y similares. La proteína total se determina fácilmente usando métodos bien conocidos en la técnica.

Como se ha explicado anteriormente, el SCC se puede suplementar con proteínas secretadas de ECEH adicionales, tales como EspA, EspB, EspD y/o Tir. También se puede añadir intimina. Estas proteínas se pueden producir de forma recombinante usando métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales Nos. WO 97/40063 y WO 99/24576 para una descripción de la producción de proteínas secretadas de ECEH recombinantes representativas. En particular, las secuencias para EspA, EspB, EspD, Tir e intimina de varios serotipos se conocen y están descritas. Véase, por ejemplo, los Nos. de acceso de GenBank AE005594, AE005595, AP002566, AE005174, NC_002695, NC_002655 para la secuencia completa del genoma de *E. coli* O157:H7, que incluye las secuencias de varias proteínas secretadas de O157:H7. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional No. WO 97/40063, así como los Nos. de acceso de GenBank Y13068, U80908, U5681, Z54352, AJ225021, AJ225020, AJ225019, AJ225018, AJ225017, AJ225016, AJ225015, AF022236 y AF200363 para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de EspA de un número de serotipos de *E. coli*. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional No. WO 99/24576, así como los Nos. de acceso de GenBank AF125993, AF132728, AF045568, AF022236, AF70067, AF070068, AF013122, AF200363, AF113597, AF070069, AB036053, AB026719, U5904 y U59502, para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de Tir de un número de serotipos de *E. coli*. Véase, por ejemplo, los Nos. de acceso de GenBank U32312, U38618, U59503, U66102, AF081183, AF081182, AF130315, AF339751, AJ308551, AF301015, AF329681, AF319597, AJ275089-AJ275113 para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de intimina de un número de serotipos de *E. coli*. Véase, por ejemplo, los números de acceso de GenBank U80796, U65681, Y13068, Y13859, X96953, X99670, X96953, Z21555, AF254454, AF254455, AF254456, AF254457, AF054421, AF059713, AF144008, AF144009 para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de EspB de un número de serotipos de *E. coli*. Véase, por ejemplo, los Nos. de acceso de GenBank Y13068, Y13859, Y17875, Y17874, Y09228, U65681, AF054421 y AF064683, para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de EspD de un número de serotipos de *E. coli*.

Estas secuencias se pueden usar para diseñar sondas de oligonucleótidos y usarse para cribar genotecas genómicas o de ADNc para genes de otros serotipos de *E. coli*. Las estrategias básicas para preparar sondas de oligonucleótidos y genotecas de ADN, así como su cribado por hibridación de ácidos nucleicos, las conocen bien los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, *DNA Cloning*: Vol. I, anteriormente; *Nucleic Acid Hybridization*, anteriormente; *Oligonucleotide Synthesis*, anteriormente; Sambrook et al., anteriormente. Una vez se ha identificado un clon de una genoteca cribada mediante hibridación positiva, se puede confirmar por análisis de enzimas de restricción y secuenciación de ADN que el inserto particular de la genoteca contiene un gen de tipo III o un homólogo del mismo. Los genes se pueden además aislar usando técnicas estándar y, si se desea, emplear planteamientos de PCR o enzimas de restricción para delecionar partes de la secuencia de longitud completa.

De forma similar, los genes se pueden aislar directamente de bacterias usando técnicas conocidas, tal como extracción con fenol y manipular además la secuencia para producir cualquier alteración deseada. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., anteriormente, para una descripción de las técnicas usadas para obtener y aislar ADN. De forma alternativa, las secuencias de ADN que codifican las proteínas de interés se pueden preparar sintéticamente más que clonaras. Las secuencias de ADN se pueden diseñar con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos particular. En general, se seleccionarán los codones preferidos para el huésped deseado si la secuencia se usa para expresión. La secuencia completa se ensambla de oligonucleótidos solapantes preparados por métodos estándar y se ensambla en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge (1981) *Nature* 292:756; Nambair et al. (1984) *Science* 223:1299; Jay et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311.

Una vez se han preparado o aislado las secuencias codificantes para las proteínas deseadas, se pueden clonar en cualquier vector o replicón adecuado. Los expertos en la materia conocen numerosos vectores de clonación y la selección de un vector de clonación apropiado es cuestión de elección. Los ejemplos de vectores de ADN recombinante para clonación y células huésped que pueden transformar incluyen el bacteriófago λ (*E. coli*), pBR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pKT230 (bacterias gram negativas), pGV1106 (bacterias gram negativas), pLAFR1 (bacterias gram negativas), pME290 (bacterias gram negativas no *E. coli*), pHV14 (*E. coli* y *Bacillus subtilis*), pBD9

(*Bacillus*), pIJ61 (*Streptomyces*), pUC6 (*Streptomyces*), Ylp5 (*Saccharomyces*), YCp19 (*Saccharomyces*) y virus del papiloma bovino (células de mamífero). Véase, Sambrook et al., anteriormente; *DNA Cloning*, anteriormente; B. Perbal, anteriormente.

5 El gen se puede colocar bajo el control de un promotor, sitio de unión a ribosomas (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador (colectivamente denominados en el presente documento como elementos de "control"), de modo que la secuencia de ADN que codifica la proteína deseada se transcriba a ARN en la célula huésped transformada por un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia codificante puede contener o no un péptido señal o secuencia líder. Las secuencias líderes pueden ser eliminadas por el huésped en el procesamiento postraduccional. Véase, por ejemplo, las patentes en EE UU Nos. 4.431.739, 4.425.437, 4.338.397.

10 También pueden ser deseables otras secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión de las secuencias de la proteína relativa al crecimiento de la célula huésped. Los expertos en la materia conocen secuencias reguladoras, y los ejemplos incluyen las que producen que la expresión de un gen se exprese o reprima en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. También pueden estar presentes otros tipos de elementos reguladores en el vector, por ejemplo, secuencias potenciadoras.

15 Las secuencias control y otras secuencias reguladoras se pueden ligar a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector, tal como los vectores de clonación descritos anteriormente. De forma alternativa, la secuencia codificante se puede clonar directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias control y un sitio de restricción apropiado.

20 En algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia codificante de modo que se puede unir a las secuencias control con la orientación apropiada, es decir, para mantener el marco de lectura apropiado. También puede ser deseable producir mutantes o análogos de la proteína. Los mutantes o análogos se pueden preparar mediante la delección de una parte de la secuencia que codifica la proteína, mediante inserción de una secuencia y/o mediante sustitución de uno o más nucleótidos en la secuencia. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos, tal como la mutagénesis dirigida se describen en, por ejemplo, Sambrook et al., anteriormente; *DNA Cloning*, anteriormente; *Nucleic Acid Hybridization*, anteriormente.

25 El vector de expresión se usa luego para transformar una célula huésped apropiada. En la técnica se conocen un número de líneas celulares de mamífero e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, pero no limitadas a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), así como otras. De forma similar, los huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus spp.*, encontrarán uso con las presentes construcciones de expresión. Los huéspedes levadura útiles en la presente invención incluyen, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Las células de insecto para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otras, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*.

30 Dependiendo del sistema de expresión y el huésped seleccionado, las proteínas de la presente invención se producen cultivando células huésped transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente en condiciones en las cuales la proteína de interés se expresa. La proteína se aísla después de las células huésped y se purifica. La selección de las condiciones de crecimiento y métodos de recuperación apropiados están en las capacidades de la técnica.

35 Las proteínas de la presente invención también se pueden producir por síntesis química tal como síntesis de péptidos en fase sólida, usando secuencias de aminoácidos conocidas o secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de ADN del gen de interés. Los expertos en la materia conocen tales métodos. Véase, por ejemplo, J. M. Stewart y J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) y G. Barany y R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editores E. Gross y J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, Nueva York, (1980), pp. 3-254, para técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida; y M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlín (1984) y E. Gross y J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, anteriormente, Vol. 1, para síntesis en solución clásica. La síntesis química puede ser preferible si un pequeño fragmento del antígeno en cuestión es capaz de inducir una respuesta inmunológica en el sujeto de interés.

40 Una vez que se producen los sobrenadantes de cultivo celular anteriores y, si se desea, proteínas recombinantes y/o purificadas adicionales, se formulan en composiciones para la administración a un sujeto mamífero. El SCC se administra solo, o mezclado con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y combinaciones de los mismos. Además, el vehículo puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tal como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH, o adyuvantes en el caso de composiciones de vacuna, que aumentan

la eficacia de la vacuna. Los adyuvantes adecuados se describen posteriormente. Las composiciones de la presente invención también pueden incluir sustancias auxiliares, tales como agentes farmacológicos, citoquinas, u otros modificadores de respuesta biológica.

5 Como se ha explicado anteriormente, las composiciones de vacuna de la presente invención incluyen adyuvantes para aumentar más la inmunogenicidad de uno o más de los antígenos de ECEH. Tales adyuvantes incluyen cualquier compuesto o compuestos que actúan para aumentar una respuesta inmunitaria hacia un antígeno o combinación de antígenos de ECEH, reduciendo de esta manera la cantidad de antígeno necesario en la vacuna y/o la frecuencia de inyección necesaria para generar una respuesta inmunitaria adecuada. Los adyuvantes pueden
10 incluir, por ejemplo, emulsionantes, muramil dipéptidos, avridina, adyuvantes acuosos tal como hidróxido de aluminio, adyuvantes basado en quitosano, y cualquiera de varias saponinas, aceites, y otras sustancias conocidas en la técnica, tales como anfígeno, LPS, extractos de pared celular bacteriana, ADN bacteriano, oligonucleótidos sintéticos y combinaciones de los mismos (Schijns et al., *Curr. Opi. Immunol.* (2000) 12:456), extracto de pared celular de *Mycobacterial phlei* (*M. phlei*) (MCWE) (Patente en EE UU No. 4.744.984), ADN de *M. phlei* (M-ADN),
15 complejo M-ADN-pared celular de *M. phlei* (MCC). Por ejemplo, los compuestos que pueden servir como emulsionantes en el presente documento incluyen agentes emulsionantes naturales y sintéticos, así como compuestos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Entre los compuestos sintéticos, los agentes emulsionantes aniónicos incluyen, por ejemplo, las sales de potasio, sodio y amonio del ácido laurico y oleico, las sales de calcio, magnesio y aluminio de ácidos grasos (es decir, jabones metálicos), y sulfonatos orgánicos, tal como laurilsulfato de sodio. Los agentes catiónicos sintéticos incluyen, por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio, mientras que los agentes no iónicos sintéticos se ejemplifican por ésteres de glicerol (por ejemplo monoestearato de glicerilo), ésteres y éteres de polioxietilenglicol, y los ésteres sorbitanos de ácidos grasos (por ejemplo, monopalmitato sorbitano) y sus derivados de polioxietileno (por ejemplo monopalmitato sorbitano de polioxietileno). Los agentes emulsionantes naturales incluyen goma arábica, gelatina, lecitina y colesterol.

25 Otros adyuvantes adecuados se pueden formar con un componente oleaginoso, tal como un único aceite, una mezcla de aceites, una emulsión de agua en aceite, o una emulsión de aceite en agua. El aceite puede ser un aceite de aceite mineral, un aceite vegetal o un aceite animal. El aceite de aceite mineral, o las emulsiones de aceite en agua en las que el componente oleaginoso es aceite de aceite mineral se prefieren. A este respecto, un "aceite de aceite mineral" se define en el presente documento como una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos de aceite mineral a través de una técnica de destilación; el término es sinónimo de "parafina líquida", "aceite mineral líquida" y "aceite mineral filante". El término también se pretende que incluya "aceite de aceite mineral fluido", es decir, un aceite que se obtiene similarmente por destilación de la aceite mineral, pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que la aceite mineral filante. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*,
30 anteriormente. Un componente oleaginoso particularmente preferido es la emulsión de aceite en agua vendida bajo el nombre comercial de EMULSIGEN PLUS™ (que comprende un aceite de aceite mineral fluido así como formalina al 0,05% y gentamicina 30 mcg/ml como conservantes), disponible de MVP Laboratories, Ralston, Nebraska. Los aceites animales adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de fletán, aceite de sábalo, aceite de reloj anaranjado y aceite de hígado de tiburón, todos los cuales están disponibles comercialmente. Los aceites vegetales adecuados incluyen, sin limitación, aceite de colza, aceite de almendra, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, y similares.

45 De forma alternativa, se pueden usar un número de bases nitrogenadas alifáticas como adyuvantes con las formulaciones de vacuna. Por ejemplo, los adyuvantes inmunológicos conocidos incluyen aminas, compuestos de amonio cuaternarios, guanidinas, benzamidinas y tiouronios (Gall, D. (1966) *Immunology* 11:369-386). Los compuestos específicos incluyen bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) (disponible de Kodak) y N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxiethyl)propandiamina ("avridina"). El uso de DDA como un adyuvante inmunológico se ha descrito; véase, por ejemplo Kodak Laboratory Chemicals Bulletin 56(1):1-5 (1986); *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5(3):163-187 (1990); *J. Controlled Release* 7:123-132 (1988); *Clin. Exp. Immunol.* 78(2):256-262 (1989); *J Immunol. Methods* 97(2):159-164 (1987); *Immunology* 58(2):245-250 (1986); e *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 68(3):201-208 (1982). La avridina también es un adyuvante conocido. Véase, por ejemplo, la patente en EE UU No. 4.310.550 a Wolff, III et al., que describe el uso de N,N-alquilo superior-N',N'-bis(2-hidroxiethyl)propano diaminas en general, y avridina en particular, como adyuvantes de vacuna. La patente en EE UU No. 5.151.267 a Babiuk, y Babiuk et al. (1986)
50 *Virology* 159:57-66, también se refieren al uso de avridina como un adyuvante de vacuna.

Particularmente preferida para el uso en el presente documento es un adyuvante conocido como "VSA3" que es una forma modificada del adyuvante EMULSIGEN PLUS™ que incluye DDA (véase la patente en EE UU No. 5.951.988).

60 Las composiciones de vacuna de SCC se pueden preparar asociando uniforme y estrechamente las preparaciones de SCC y el adyuvante usando técnicas que conocen bien los expertos en la materia incluyendo, pero no limitadas a, mezcla, sonicación y microfluidación. El adyuvante preferiblemente comprenderá aproximadamente del 10 al 50% (v/v) de la vacuna, más preferiblemente aproximadamente del 20 al 40% (v/v) y lo más preferiblemente aproximadamente del 20 al 30% o el 35% (v/v), o cualquier número entero en estos intervalos.

65

Las composiciones de la presente invención normalmente se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas o como formas sólidas que son adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede preparar en forma sólida, emulsionada o el principio activo encapsulado en vehículos liposomas u otros soportes particulados usados para la administración sostenida. Por ejemplo, la vacuna puede estar en forma de una emulsión de aceite, emulsión de agua en aceite, emulsión de agua en aceite en agua, emulsión específica de sitio, emulsión de residencia larga, emulsión pegajosa, microemulsión, nanoemulsión, liposoma, micropartícula, microesfera, nanoesfera, nanopartícula y varios polímeros naturales o sintéticos, tal como polímeros impermeables no reabsorbibles, tal como copolímeros de acetato de etilenvinilo y copolímeros de Hytrel®, polímeros hinchables tal como hidrogeles, o polímeros reabsorbibles, tal como colágeno y ciertos poliácidos o poliésteres tal como los usados para hacer suturas reabsorbibles, que permiten la liberación sostenida de la vacuna.

Además, los polipéptidos se pueden formular en composiciones en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de los polipéptidos activos) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tal como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas de los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, y similares.

Los métodos reales de preparar tales formas farmacéuticas los conocen, o serán aparentes para, los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 18ª edición, 1990.

La composición se formula para contener un cantidad eficaz de antígeno de ECEH secretado, la cantidad exacta la determina fácilmente el experto en la materia, en donde la cantidad depende del animal que se va a tratar y la capacidad del sistema inmunitario del animal para sintetizar anticuerpos. La composición o formulación que se va a administrar contendrá una cantidad de uno o más antígenos de ECEH secretados adecuados para alcanzar el estado deseado en el sujeto que se va a tratar. Para los fines de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna que comprende SCC con o sin antígenos de ECEH secretados recombinantes y/o purificados añadidos, contiene aproximadamente de 0,05 a 1500 µg de proteína de ECEH secretada, preferiblemente aproximadamente de 10 a 1000 µg de proteína de ECEH secretada, más preferiblemente aproximadamente de 30 a 500 µg y lo más preferiblemente aproximadamente de 40 a 300 µg, o cualquier número entero entre estos valores. EspA + Tir, así como otros antígenos de ECEH, pueden comprender aproximadamente del 10% al 50% de la proteína total del SCC, tal como aproximadamente del 15% al 40% y lo más preferiblemente aproximadamente del 15% al 25%. Si se suplementa con rEspA + rTir, la vacuna puede contener aproximadamente de 5 a 500 µg de proteína, más preferiblemente aproximadamente de 10 a 250 µg y lo más preferiblemente aproximadamente de 20 a 125 µg.

Las vías de administración incluyen, pero no están limitadas a, oral, tópica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, transdérmica y subdérmica. Dependiendo la vía de administración, el volumen por dosis es preferiblemente aproximadamente de 0,001 a 10 ml, más preferiblemente aproximadamente de 0,01 a 5 ml, y los más preferiblemente aproximadamente de 0,1 a 3 ml. Las vacunas se pueden administrar en un tratamiento de dosis única o en tratamientos de dosis múltiples (refuerzo) en un plan y a lo largo de un periodo de tiempo apropiado a la edad, peso y estado del sujeto, la formulación de vacuna particular usada, y la vía de administración.

Cualquier medio de administración farmacéutico adecuado se puede emplear para administrar las composiciones al sujeto vertebrado. Por ejemplo, jeringas de agujas convencionales, inyector de gas (aire) de resorte o comprimido (patentes en EE UU nos. 1.605.763 a Smoot; 3.788.315 a Laurens; 3.853.125 a Clark et al.; 4.596.556 a Morrow et al.; y 5.062.830 a Dunlap), inyector de chorro líquido (patentes en EE UU Nos. 2.754.818 a Scherer; 3.330.276 a Gordon; y 4.518.385 a Lindmayer et al.), e inyector de partículas (patentes en EE UU Nos. 5.149.655 a McCabe et al.; y 5.204.253 a Sanford et al.) son todos apropiados para la administración de las composiciones.

Si se usa un inyector de chorro, se expulsa un único chorro de la composición de vacuna líquida a alta presión y velocidad, por ejemplo, 1200-1400 PSI, creando con ello una apertura en la piel y penetrando a profundidades adecuadas para la inmunización.

C. Experimental

60 **Ejemplo 1**

Preparación de sobrenadante de cultivo celular (SCC)

Se hicieron crecer ECEH O157:H7 de tipo salvaje en condiciones para maximizar la síntesis de proteínas de SCC (Li et al., *Infect. Immun.* (2000) 68:5090). Brevemente, un cultivo en posición erguida durante la noche de ECEH O157:H7 se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) durante la noche a 37°C (CO₂ al ±5%). El cultivo se diluyó 1:10 en

medio mínimo M-9 suplementado con casaminoácidos al 0,1%, glucosa al 0,4%, MgSO₄ 8 mM y NaHCO₃ 44 mM. Los cultivos se hicieron crecer en posición erguida a 37°C en CO₂ al 5% hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,7 a 0,8 (6-8 horas). Las bacterias se eliminaron por centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se concentró 100 veces por ultrafiltración y la proteína total se determinó por el método de ensayo de proteína de ácido bicinonínico.

La figura 1 muestra los marcadores de peso molecular (carril 1) y un perfil típico de proteínas de SCC obtenido por electroforesis de CSS en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS (SDS-PAGE) seguido por tinción con azul de Coomassie (carril 2). Se indican las posiciones de EspA (25 kD), EspB/EspD (40 kD), Tir sin degradar (70 kD) y Tir degradada (55 kD). Como se determina por análisis densitométrico usando un HP Scanjet 5100C y el programa de software ID de Advance American Biotechnology (Fullerton, CA, EE UU), EspA era aproximadamente el 5%, Tir sin degradar aproximadamente el 20% y Tir degradada aproximadamente el 6% de la proteína total. Sin embargo, los porcentajes de proteínas determinados por análisis densitométrico de los geles de SDS-poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie no es exacto debido a variaciones en la tinción de fondo, variaciones en la captación de la tinción de azul de Coomassie, variaciones en la densidad de las bandas y otros factores que conocen los expertos en la materia.

Ejemplo 2

Preparación de proteínas recombinantes

Se aislaron los genes que codifican EspA, EspB, intimina y Tir (Li et al., *Infect. Immun.* (2000) 68:5090). Se usó un aislado clínico de ECEH O157:H7 como la fuente de ADN. Se amplificaron EspA, EspB, Tir y la región de *eae* que codifica los 280 aminoácidos carboxilo terminales de intimina a partir del ADN cromosómico usando PCR para introducir sitios de restricción únicos, seguido por clonación en los plásmidos apropiados. Los plásmidos resultantes se cortaron y ligaron para crear fusiones con etiquetas de histidina. Los plásmidos se electrocutaron en una cepa de expresión de *E. coli* y las *E. coli* se propagaron (Ngeleka et al., *Infect. Immun.* (1996) 64:3118). La expresión génica se dirigió usando el promotor Tac después de inducción con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido). Las bacterias se sedimentaron, se resuspendieron en solución salina tamponada con Tris y se lisaron por sonicación. El lisado se centrifugó para eliminar material insoluble y las proteínas con etiqueta de histidina se purificaron mediante su paso a través de una columna de cromatografía de afinidad de níquel de fase sólida que específicamente se une a proteínas que contienen la etiqueta de histidina. Todas las preparaciones de proteínas recombinantes se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La pureza de las proteínas recombinantes se valió por SDS-PAGE en geles al 10% seguido por tinción con azul de Coomassie. En la figura 2 se muestran perfiles de geles típicos de las proteínas recombinantes (r) cromatográficamente purificadas. rEspA (carril 2), rEspB (carril 3) y rIntimina (carril 4) se recuperaron en forma relativamente pura, pero rTir (carril 5) estaba sometida a alguna degradación.

Ejemplo 3

Formulación de vacuna y administración

Se formularon las vacunas mezclando SCC o rEspA + rTir en 2 ml de un soporte que contenía del 30 al 40% de un adyuvante. Las vacunas se administraron por vía subcutánea. Los animales se inmunizaron el día 1 y de nuevo a intervalos de 3-4 semanas (refuerzo). Las muestras de suero se obtuvieron antes de la primera inmunización, en el momento de cada inyección de refuerzo y al final del experimento.

La respuesta serológica a la inmunización se determinó usando un ensayo de inmunoenzimología (ELISA). Se usaron cien µl de rEspA (0,16 µg/pocillo), rTir (0,1 µg/pocillo), rEspB (0,24 µg/pocillo) y rIntimina (0,187 µg/pocillo) para recubrir los pocillos en placas de microtitulación y las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron 3X, se bloquearon con leche desnatada en polvo al 0,5% en solución salina tamponada con fosfato. Se añadieron diluciones en serie de los sueros a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Los pocillos se lavaron y bloquearon y se añadieron 100 µl de anticuerpos anti-inmunoglobulina G bovina de conejo conjugados con peroxidasa (1:5000) a cada pocillo durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavaron y placas se leyeron a una longitud de onda de 492 nm.

Ejemplo 4

Animales experimentales

Se adquirió ganado vacuno, entre las edades de 8 y 12 meses, de ganaderos locales. Las muestras fecales se obtuvieron a diario de cada animal durante 14 días. El número de ECEH O157:H7 en las muestras fecales se determinó sembrando en agar Rainbow. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días y se contaron las colonias negras. Se puntuó el crecimiento de 0-5. Los animales que tenían una puntuación de 0 (sin ECEH O157:H7) se usaron en todos los experimentos.

Ejemplo 5

Modelo de colonización animal

5 Se desarrolló un modelo para la colonización por ECEH O157:H7 de ganado vacuno, en donde la infección se sostuvo durante >2 meses, usando un protocolo de dosis-titulación.

10 Se cultivó ECEH O157:H7 como en el ejemplo 1. Se dividieron veinticuatro vacas en 3 grupos de 8 animales cada uno. El grupo 1 recibió 10^6 , el grupo 2 10^8 y el grupo 3 10^{10} UFC de ECEH O157:H7 mediante intubación orogástrica en un volumen de 50 ml el día 0.

15 Para seguir la excreción, el material fecal se recogió los días 1 a 14. El material fecal se pesó, se resuspendió en solución salina estéril y se inoculó en medio de cultivo. Se determinó la densidad del cultivo como en el ejemplo 1.

20 Como se muestra en la figura 3, no hubo diferencia significativa entre los números de ECEH O157:H7 excretadas por el ganado vacuno del grupo 2 (10^8 UFC) y el grupo 3 (10^{10} UFC). El ganado del grupo 2 excretó la mayoría de la ECEH O157:H7 en cada uno de los 14 días. El número de ECEH O157:H7 excretada por el ganado vacuno del grupo 2 alcanzó un máximo el día 6 y disminuyó a cero el día 14.

25 Los animales que excretan ECEH O157:H7 (de aquí en adelante, "positivo") se mantuvieron 40 días adicionales tiempo durante el cual el número de ECEH O157:H7 excretada disminuyó a un nivel indetectable. La excreción de ECEH O157:H7 por animales previamente positivos (de aquí en adelante, "portadores") se reactivó reteniendo la alimentación durante 24 horas y vacunando con vacunas comercialmente disponibles clostridiales o de *H. somnus*. Como se muestra en la figura 4, el número de animales portadores que excretan ECEH O157:H7 alcanzó un máximo de aproximadamente el 50% en los días 6 y 7 tras la reactivación y disminuyó a cero el día 15.

30 Como una dosis de 10^8 UFC produjo un número detectable de ECEH O157:H7 excretada durante los 14 días tras la infección (figura 3) y produjo animales persistentemente infectados (figura 4), esta dosis se usó como la dosis de exposición en experimentos posteriores.

Ejemplo 6

Capacidad protectora de SCC

35 Para probar el potencial de vacuna de las proteínas secretadas, se mezcla SCC con el adyuvante oleaginoso VSA3 (patente en EE UU No. 5.951.988; S. van Drunen Littel-van den Hurk et al., *Vaccine* (1993) 11:25) de modo de cada dosis de 2 ml contenía 200 µg de proteína de SCC y el 30% (v/v) de adyuvante (vacuna de SCC). Para el grupo control, se mezcló solución salina estéril con VSA3, de modo que cada dosis de 2 ml contenía 0 µg de proteína de SCC y el 30% (v/v) de adyuvante (vacuna de solución salina).

40 Se dividieron dieciséis vacas en 2 grupos de ocho animales cada uno. El ganado vacuno del grupo 1 recibió 2 ml de vacuna de SCC por vía subcutánea (experimental) y el ganado vacuno del grupo 2 recibió 2 ml de vacuna de solución salina por vía subcutánea (control) los días 1 y 22 (refuerzo). Se evaluó la seroconversión por ELISA (ejemplo 3), los días 1 (preinmunización), 22 y 36. Como se muestra en la tabla 1, el día 22, los animales del grupo 1 mostraron títulos de anticuerpos específicos contra EspA y Tir y, el día 36, estos títulos mostraron un aumento significativo. Los animales del grupo 2 no mostraron títulos de anticuerpos específicos los días 22 y 36. En particular, el grupo que recibió la vacuna de ECEH mostró una aumento de 13 veces en el título de anticuerpos específicos hacia proteínas secretadas de tipo III después de una única inmunización y después del primer refuerzo, los ocho animales en el grupo de vacuna de ECEH demostraron un aumento de 45 veces en el título de anticuerpos específicos mientras que solo uno del grupo de vacuna placebo se seroconvirtió (X^2 , $p=0,0002$).

Tabla 1
Respuesta serológica a la inmunización con SCC

Grupo	Títulos de anticuerpos específicos* - Medias de grupos		
	Preinmunización (día 1)	Refuerzo (día 22)	Exposición (día 36)
1. Experimental	350	5.000	12.500
2. Control	450	500	650

* Los valores son medias de grupo expresadas como el recíproco de la dilución mayor que da un resultado positivo.

60 El día 36, los animales del grupo 1 y del grupo 2 se expusieron con 10^8 UFC de ECEH O157:H7 mediante intubación orogástrica y se siguió la excreción fecal durante 14 días (ejemplo 5). Como se resume en la tabla 2, menos animales experimentales excretaron ECEH O157:H7 que animales control (figura 7). En particular, el número mediano de días durante los cuales el organismo se excretó en los animales vacunados fue 1,5 comparado con 3,5 en el grupo placebo (prueba de orden con signo de Wilcoxin, $p=0,08$). Siete de ocho animales inmunizados con

placebo excretaron las bacterias durante el ensayo y cuatro de estos animales excretaron las bacterias durante cuatro o más días consecutivos, lo que indica que estaban infectados persistentemente. Cinco de ocho animales inmunizados con la vacuna de ECEH excretaron las bacterias en algún punto durante el ensayo pero solo un animal excretó el organismo durante más de dos días consecutivos, lo que indica que la colonización era transitoria y significativamente menor que en el grupo de placebo. El número total de bacterias aisladas de muestras fecales era significativamente menor entre el grupo vacunado con ECEH comparado con el grupo de placebo (prueba de orden con signo de Wilcoxin, $p=0,05$), teniendo el primero una mediana de 6,25 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces recuperadas comparada con una mediana de 81,25 UFC/g del último. Por tanto, la vacunación con las proteínas secretadas de tipo III parecía reducir la capacidad del organismo para colonizar el intestino como se refleja por el descenso en el número de días que los animales excretan el organismo así como los números de bacterias excretadas detectadas por cultivo fecal.

Tabla 2
Excreción por animales experimentales y control

	Experimental	Control
Animales que excretan >1 día	1/8	6/8
Número de días con puntuaciones de >1	1	8
Días medios de excreción por animal	0,875	2,5
Días totales de excreción por grupo	7	20

Estos datos muestran que el SCC indujo una respuesta de anticuerpos en ganado vacuno que redujo tanto el número de animales que excretaban ECEH O157:H7 como el número de días durante los cuales se excretaban ECEH O157:H7.

Para aumentar la eficacia de la formulación de vacuna, se inmunizaron grupos de 6 terneras como se ha descrito anteriormente con una de tres dosis de proteínas secretadas (50 μ g, 100 μ g, 200 μ g) o un placebo y la respuesta serológica se midió en muestras de suero tomadas los días 0, 21 (refuerzo) y 35. No se observó diferencia significativa en las respuestas anti-ECEH, anti-Tir o anti-EspA entre ninguno de los grupos que recibieron la vacuna contra ECEH en ningún punto temporal pero las tres eran significativamente mayores que el grupo de placebo los días 21 y 35. Por tanto, se diseñó un segundo ensayo de vacuna en el que tres grupos de ganado vacuno de un año se inmunizaron tres veces con 50 μ g de proteínas secretadas ($n=13$), 50 μ g de proteínas de un mutante de *tir* (Δ Tir, $n=10$) o un placebo ($n=25$). El adyuvante usado fue VSA3 y los animales se inmunizaron por inyección subcutánea los días 0, 21 y 35, seguido por exposición oral con *E. coli* O157:H7 el día 49. La respuesta serológica a la inmunización se muestra en la tabla 3 (días 0 y 49 solo) y era comparable a la observada en el ensayo descrito anteriormente. El grupo que recibió la vacuna de Δ Tir mostró una respuesta de magnitud similar contra las proteínas secretadas totales que el grupo que recibió la vacuna preparada de la cepa de tipo salvaje, pero, como se esperaba, una respuesta reducida a Tir (prueba de orden con signo de Wilcoxin, $p=0,006$). Sin embargo, el primer grupo mostró un aumento en los niveles de anticuerpos anti-Tir (prueba de orden con signo de Wilcoxin, $p=0,009$), lo que indica o bien exposición a un organismo que produce una molécula inmunológicamente relacionada o exposición natural a *E. coli* O157:H7. Esto está apoyado además por la observación de que hubo un aumento significativo en el título de anticuerpo anti-Tir en el grupo de placebo el día de la exposición (prueba de orden con signo de Wilcoxin, $p=0,002$) pero sin diferencia entre los grupos de placebo o Δ Tir ($p=0,37$, ANOVA Kruskal-Wallis) y era significativamente mayor que los animales inmunizados con placebo ($p<0,0001$).

Tabla 3. Respuesta serológica mediana a la inmunización con proteínas secretadas preparadas de *E. coli* O157:H7 (ECEH) de tipo salvaje, un mutante *tir* isogénico (Δ Tir) o un placebo. Los títulos se expresan como valores medios geométricos de la última dilución positiva del suero (.). Los números en paréntesis representan el 25°-75° percentil.

Grupo	n	anti-ECEH		anti-Tir		anti-EspA	
		Día 0	Día 49	Día 0	Día 49	Día 0	Día 49
EHEC	13	10	6400	100	1600	100	400
		(10-100)	(3200-12800)	(10-200)	(800-3200)	(10-200)	(200-1600)
Δ Tir	10	10	6400	10	200	100	300
		(10-100)	(3200-25600)	(10-200)	(100-800)	(10-200)	(100-1600)
Placebo	25	10	10	100	200	100	100
		(10-200)	(10-200)	(10-200)	(10-400)	(10-200)	(10-200)

La respuesta inmunitaria contra cada formulación de vacuna también se analizó cuantitativamente por inmunotransferencia usando sueros de dos animales representativos por grupo. Los resultados para animales representativos se muestran en la figura 8 y demuestran que las proteínas secretadas por el sistema de tipo III eran altamente inmunogénicas en ganado vacuno. La respuesta en los grupos de vacuna de ECEH y Δ Tir era similar con la excepción de la respuesta contra Tir que estaba ausente en el último grupo (figura 8, paneles superiores). EspB, EspD y Tir eran todas reactivas, y después de la segunda inmunización el día 21 también se observó una respuesta significativa contra lipopolisacárido. La cinética de la respuesta inmunitaria en un animal vacunado (figura 8, paneles inferiores) muestra que los anticuerpos anti-Tir eran detectables después de una única inmunización, como lo eran

los anticuerpos contra proteínas de 43 kDa y 100 kDa. Las últimas proteínas eran producidas por la cepa de tipo salvaje así como por los mutantes *sepB* y *tir* y la proteína de 100 kDa es probablemente EspP, una proteína secretada de ECEH no de tipo III.

5 Después de la exposición oral con *E. coli* O157:H7 el día 49, cada grupo se siguió a diario para excreción fecal del organismo durante 14 días. En este experimento, las bacterias se cultivaron después del enriquecimiento inmunomagnético (J. Van Donkersgoed et al., *Can. Vet. J.* (2001) 42:714; Chapman y Siddons, *J. Med. Microbiol.* (1996) 44:267) más que siembra directa ya que el ganado vacuno de un año excreta menos que las terneras en este modelo de infección. El día de la exposición, dos animales en el grupo de placebo dieron positivo en el cultivo para *E. coli* O157:H7 y se eliminaron del ensayo. Los animales inmunizados con placebo excretaron el organismo después de la exposición mucho más que esos en los dos grupos de vacunas de ECEH (figura 9). Los que recibieron la vacuna de placebo excretaron el organismo durante una mediana de 4 días, significativamente más largo que la mediana de 0 días por los otros dos grupos de vacuna ($p=0,0002$, ANOVA Kruskal-Wallis). Se recuperaron significativamente menos bacterias de los grupos de vacunas de ECEH y Δ Tir ($p=0,04$, ANOVA Kruskal-Wallis). Desde el día 2 tras la infección en adelante, el 78% de los animales de placebo excretaron el organismo durante al menos un día comparado con el 15% de los vacunados con ECEH y el 30% de Δ Tir (tabla 4).

Los datos presentados anteriormente demuestran que los factores de virulencia de ECEH, es decir, los secretados por el sistema de tipo III, se pueden usar como componentes eficaces de vacuna para la reducción de colonización de ganado vacuno por bacterias ECEH, tal como ECEH O157:H7. Estas proteínas son dianas principales de la respuesta inmunitaria en seres humanos después de la infección (Li et al., *Infect. Immun.* (2000) 68:5090), aunque el ganado vacuno habitualmente no monta una respuesta serológica significativa contra estas proteínas después de la exposición natural al organismo. Sin embargo, los animales vacunados con estas proteínas se sensibilizan y muestran un aumento en los títulos de anti-ECEH y anti-Tir después de la exposición oral con el organismo.

Tir probablemente se requiera para la colonización del intestino bovino, y esto está apoyado por la observación de que una vacuna que contiene proteínas secretadas de una cepa de *E. coli* O157:H7 Δ Tir no era tan eficaz como una formulación idéntica de un aislado isogénico de tipo salvaje. Sin embargo, la primera vacuna era significativamente más eficaz que el placebo lo que sugiere que la inmunidad contra la colonización es multifuncional de naturaleza. Esto está apoyado por el análisis de inmunotransferencia de la respuesta a la inmunización en el que se reconocieron varios componentes proteicos así como lipopolisacárido. La contribución a la protección por lipopolisacárido no es conocida, pero la presencia de anticuerpos contra esta molécula no se correlaciona con protección en un modelo de ECEH murino (Conlan et al., *Can. J. Microbiol.* (1999) 45:279; Conlan et al., *Can. J. Microbiol.* (2000) 46:283). Además, la inmunización con Tir y EspA recombinantes puede reducir los números de bacterias excretadas, pero no los números reales de animales ni la duración de la excreción.

La prevalencia de serotipo no O157 en Norteamérica parece estar aumentando y representa una parte significativa de las infecciones por ECEH en otras localizaciones geográficas. Puesto que los antígenos secretados de tipo III parecen estar relativamente conservados entre serotipos de ECEH no O157, esta formulación de vacuna probablemente da amplia protección cruzada, en contraste con formulaciones basadas en el antígeno LPS de O157.

Tabla 4. Número de animales que excretan *E. coli* O157:H7 en cualquier tiempo entre el día 2 y el 14 tras la exposición.

Vacuna	Número que excreta	n	Porcentaje de excreción	valor de p
ECEH	2	13	15,4	0,003
Δ Tir	3	10	30	0,008
Placebo	18	23	78,3	1

Ejemplo 7

Capacidad protectora de rEspA + rTir y rEspB + rIntimina

Se mezclaron rEspA, rTir, rEspB y rIntimina con el adyuvante oleaginoso VSA3, de modo que cada dosis de 2 ml contenía 50 μ g de rEspA + rTir o de rEspB + rIntimina y el 30% (v/v) de adyuvante. Se mezcló solución salina estéril con VSA3 de modo que cada dosis de 2 ml contenía 0 μ g de rEspA + rTir o de rEspB + rIntimina y el 30% (v/v) de adyuvante.

Treinta y cuatro vacas se dividieron en 4 grupos. Diez vacas, grupo 1, se inmunizaron con la vacuna rEspA + rTir (experimental) y 10 vacas, grupo 2, se inmunizaron con la vacuna rEspB + rIntimina (experimental) los días 1, 22 (refuerzo) y 36. Siete vacas, grupo 3, y 7 vacas, grupo 4, se inmunizaron con vacuna de solución salina (control) los días 1, 22 (refuerzo) y 36. Se ensayó la seroconversión por ELISA (ejemplo 3) los días 1 (preinmunización), 22 y 36. Como se muestra en la figura 5, el día 22, los animales del grupo 1 mostraron títulos de anticuerpos específicos hacia rEspA y hacia rTir y los animales del grupo 2 mostraron títulos de anticuerpos específicos hacia rEspB y hacia rIntimina. Además, como se muestra en la figura 5, el día 36, los animales del grupo 1 mostraron un aumento en el título de anticuerpos específicos hacia rTir y sin cambio en el título de anticuerpos específicos hacia rEspA y los

animales del grupo 2 mostraron un aumento en el título de anticuerpos específicos hacia rIntimina y un descenso en el título de anticuerpos específicos hacia rEspB. Los animales de los grupos 3 y 4 no mostraron títulos de anticuerpos específicos en los días 22 y 36.

- 5 El día 36, los animales de los grupos 1-4 se expusieron con 10^8 UFC de ECEH O157:H7 y se siguió la excreción a diario durante 14 días (ejemplo 5). Como se muestra en la figura 6, la diferencias en la excreción entre los animales del grupo 1 (rTir + rEspA) y los animales del grupo 3 (solución salina) era mínima durante los primeros 5 días tras la exposición. Sin embargo, durante la segunda semana tras la exposición las diferencias en los animales del grupo 1 y los animales del grupo 3 eran evidentes. Menos animales del grupo 1 excretaron ECEH O157:H7 que animales del grupo 3. Los animales del grupo 1 excretaron menos ECEH O157:H7 en sus heces durante periodos de tiempo más cortos que los animales del grupo 3. Las diferencias en la excreción entre los animales del grupo 2 (rEspB + rIntimina) y el grupo 4 (solución salina) no eran evidentes con respecto al número de animales que excretaban, el número de ECEH O157:H7 excretada y el periodo de tiempo de excreción.
- 10
- 15 Estos datos muestran que la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna de rEspA + rTir interfería con la colonización por ECEH O157:H7 de ganado vacuno, mientras que la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna de rEspB + rIntimina no interfería con la colonización por ECEH O157:H7 de ganado vacuno.

Ejemplo 8

20 *Capacidad protectora de SCC + rEspA + rTir*

Se mezclaron SCC, SCC + rEspA, SCC + rTir, SCC + rEspA + rTir y solución salina con un adyuvante.

- 25 Se dividieron veinticinco vacas en 5 grupos de 5 vacas y se inmunizaron los días 1 y 22 (refuerzo). El grupo 1 recibe la vacuna de SCC, el grupo 2, la vacuna de SCC + rEspA, el grupo 3 la vacuna de SCC + rTir, el grupo 4 la vacuna de SCC + rEspA + rTir y el grupo 5 la vacuna de solución salina. La seroconversión se ensaya por ELISA (ejemplo 3) los días 1 (preinmunización), 22 (refuerzo) y 36. Los días 22 y 36 cada uno de los animales de los grupos 1-5 muestra títulos de anticuerpos específicos contra EspA y Tir, mientras que los animales del grupo 6 no muestran títulos de anticuerpos específicos.
- 30

- El día 36, los animales de los grupos 1-5 se exponen con 10^8 UFC de ECEH O157:H7 y se sigue la excreción a diario durante 14 días (ejemplo 5). Menos animales de los grupos 1-4 excretan ECEH O157:H7 que animales en el grupo 5. Los animales del grupo 5 excretan la mayoría de la ECEH O157:H7; los animales del grupo 1 excretan menos ECEH O157:H7 que los animales del grupo 5 y los animales de los grupos 2-4 excretan menos ECEH O157:H7 que los animales del grupo 1.
- 35

Ejemplo 9

40 *Capacidad protectora de SCC con varios antígenos*

Se mezcla SCC con un adyuvante, de modo que cada dosis de ml contiene 0, 50, 100 o 200 µg de SCC y el 30% (v/v) de adyuvante (tabla 5).

45 **Tabla 5**
Capacidad protectora de SCC con varios antígenos

Antígeno	Grupo	µg	Adyuvante
SCC	1	50	Emulsigen-Plus
SCC	2	100	Emulsigen-Plus
SCC	3	200	Emulsigen-Plus
SCC	4	200	Carbigen
SCC	5	100	MCC
SCC	6	200	MCC
SCC	7	200	MCC + Carbigen
SCC	8	200	VSA
SCC	9	0 (control)	Emulsigen-Plus

- 50 Se dividen setenta y dos vacas en 9 grupos de 8 vacas. Los animales de los grupos 1-8 se inmunizan con SCC + adyuvante (tabla 5) y el ganado del grupo 9 se inmuniza con solución salina + adyuvante los días 1 y 22 (refuerzo). La seroconversión se analiza por ELISA (ejemplo 3) los días 1 (preinmunización), 22 (refuerzo) y 36. Los animales de los grupos 1-8 (SCC + adyuvante) muestran títulos de anticuerpos específicos hacia EspA y Tir los días 22 y 36. Los animales del grupo 9 (solución salina + adyuvante) no muestran títulos de anticuerpos específicos los días 22 y 36.
- 55

Ejemplo 10

Capacidad protectora de SCC en vacas lecheras

5 Se dividieron veinte vacas lecheras adultas en 2 grupos de 10 vacas. El grupo 1 se inmuniza con vacuna de SCC y el grupo 2 se inmuniza con vacuna de solución salina los días 1 y 22 (refuerzo). La seroconversión se ensaya por ELISA (ejemplo 3) los días 1 (preinmunización), 22 (refuerzo) y 36. Los días 22 y 36 las vacas del grupo 1 muestran títulos de anticuerpos específicos contra EspA y Tir, mientras que las vacas del grupo 2 no muestran títulos de anticuerpos específicos.

10 El día 36, las vacas de los grupos 1 y 2 se exponen con 10^8 UFC de ECEH O157:H7 y se sigue la excreción a diario durante 14 días (ejemplo 5). Menos vacas del grupo 1 excretan ECEH O157:H7 que vacas del grupo 2. Las vacas del grupo 1 excretan menos ECEH O157:H7 durante un periodo de tiempo más corto que las vacas del grupo 2.

15 Seis meses después de la inmunización inicial, las vacas del grupo 1 y 2 se inmunizan otra vez (2º refuerzo) a través de la vía subcutánea. El día 14 después del 2º refuerzo, se ensayan los títulos de los anticuerpos por ELISA (ejemplo 3). Las vacas del grupo 1 tienen títulos de anticuerpos específicos hacia EspA y Tir, mientras que las vacas del grupo 2 no tienen títulos de anticuerpos específicos.

20 El día 14 después del 2º refuerzo, las vacas de los grupo 1 y 2 se exponen otra vez con 10^8 UFC de ECEH O157:H7 y se sigue la excreción a diario durante 14 días (ejemplo 5). Menos vacas del grupo 1 (SCC) excretan ECEH O157:H7 que vacas del grupo 2 (solución salina). Las vacas del grupo 1 excretan menos ECEH O157:H7 durante periodos de tiempo más cortos que las vacas del grupo 2.

Ejemplo 11

25

Capacidad protectora de SCC en terneras

30 Diez terneras destetadas (3-6 meses de edad) se dividen en 2 grupos de 5 terneras y se inmunizan antes de entrar en un lote de alimentación (día 0) y el día de entrada en un lote de alimentación (día 1, refuerzo). Las terneras del grupo 1 reciben vacuna de SCC y las terneras del grupo 2 reciben vacuna de solución salina. La seroconversión se ensaya por ELISA (ejemplo 3) los días 0, 1 y 14. Los días 1 y 14, las terneras del grupo 1 (SCC) muestran títulos de anticuerpos específicos hacia EspA y Tir, mientras que las terneras del grupo 2 (solución salina) no muestran títulos de anticuerpos específicos.

35 El día 14, las terneras de los grupos 1 y 2 se exponen con 10^8 UFC de ECEH O157:H7 y se sigue la excreción a diario durante 14 días (ejemplo 5). Menos terneras del grupo 1 excretan ECEH O157:H7 que terneras del grupo 2. Las terneras del grupo 1 excretan menos ECEH O157:H7 durante un periodo de tiempo más corto que las terneras del grupo 2.

40 Diez terneras destetadas (3-6 meses de edad) se dividen en 2 grupos de 5 terneras y se inmunizan el día de entrada en un lote de alimentación (día 1) y el día 22 (refuerzo) en el lote de alimentación. Las terneras del grupo 1 reciben vacuna de SCC y las terneras del grupo 2 reciben vacuna de solución salina. La seroconversión se ensaya por ELISA (ejemplo 3) los días 1 (preinmunización), 22 y 36. Los días 22 y 36, las terneras del grupo 1 (SCC) muestran títulos de anticuerpos específicos hacia EspA y Tir, mientras que las terneras del grupo 2 (solución salina) no muestran títulos de anticuerpos específicos.

50 El día 36, las terneras de los grupos 1 y 2 se exponen con 10^8 UFC de ECEH O157:H7 y se sigue la excreción a diario durante 14 días (ejemplo 5). Menos terneras del grupo 1 excretan ECEH O157:H7 que terneras del grupo 2. Las terneras del grupo 1 excretan menos ECEH O157:H7 durante un periodo de tiempo más corto que las terneras del grupo 2.

Ejemplo 12

55

Capacidad protectora de SCC en ovejas

60 Se dividen veinte ovejas adultas en 2 grupos de 10 ovejas. El grupo 1 se inmuniza con vacuna de SCC y el grupo 2 se inmuniza con vacuna de solución salina el día 1 y el día 22 (refuerzo). La seroconversión se ensaya por ELISA (ejemplo 3) los días 1 (preinmunización), 22 y 36. Los días 22 y 36, las ovejas del grupo 1 muestran títulos de anticuerpos específicos contra EspA y Tir, mientras que las ovejas del grupo 2 no muestran títulos de anticuerpos específicos.

65 El día 36, las ovejas de los grupos 1 y 2 se exponen con 10^8 UFC de ECEH O157:H7 y se sigue la excreción a diario durante 14 días (ejemplo 5). Menos ovejas del grupo 1 excretan ECEH O157:H7 que ovejas del grupo 2. Las ovejas del grupo 1 excretan menos ECEH O157:H7 durante un periodo de tiempo más corto que las ovejas del grupo 2.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de un sobrenadante concentrado de cultivo celular de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), en donde el sobrenadante de cultivo celular, cultivado en medio mínimo M-9 suplementado con NaHCO₃ 20-100 mM, MgSO₄ 5-10 mM, glucosa del 0,1-1,5% y casaminoácidos del 0,05-0,5%, comprende un antígeno secretado por un sistema de secreción de tipo III y es capaz de estimular una respuesta inmunitaria contra ECEH, y un adyuvante inmunológico.
- 10 2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde ECEH es ECEH O157:H7.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde ECEH es ECEH O157:NM.
- 15 4. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el adyuvante inmunológico comprende una emulsión de aceite en agua.
5. La composición de vacuna de la reivindicación 4, en donde el adyuvante inmunológico comprende un aceite de aceite mineral y bromuro de dimetildioctadecilamonio.
- 20 6. La composición de vacuna de la reivindicación 5, en donde el adyuvante inmunológico es VSA3.
7. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el adyuvante inmunológico está presente en la composición a una concentración del 10% al 50% (v/v).
- 25 8. La composición de vacuna de la reivindicación 7, en donde el adyuvante inmunológico está presente en la composición a una concentración del 20% al 30% (v/v).
9. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además uno o más antígenos de ECEH recombinantes o purificados seleccionados del grupo que consiste en EspA, EspB, EspD, Tir e íntimina.
- 30 10. La composición de vacuna de la reivindicación 9, en donde EspA + Tir comprenden al menos el 20% de la proteína celular presente en la composición.
- 35 11. Uso de un sobrenadante de cultivo celular de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), en donde el sobrenadante de cultivo celular, cultivado en medio mínimo M-9 suplementado con NaHCO₃ 20-100 mM, MgSO₄ 5-10 mM, glucosa del 0,1-1,5% y casaminoácidos del 0,05-0,5%, comprende un antígeno secretado por un sistema de secreción de tipo III, en la fabricación de una composición de vacuna para provocar una respuesta inmunológica en un mamífero contra un antígeno de ECEH secretado, en donde dicha respuesta inmunológica proporciona protección contra la infección por ECEH, y en donde dicha composición de vacuna comprende un adyuvante inmunológico.
- 40 12. El uso de la reivindicación 11, en donde ECEH es ECEH O157:H7.
- 45 13. El uso de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde el mamífero es un rumiante.
14. El uso de la reivindicación 13, en donde el rumiante es un sujeto bovino.
- 50 15. El uso de la reivindicación 11, en donde el adyuvante inmunológico comprende una emulsión de aceite en agua.
16. El uso de la reivindicación 15, en donde el adyuvante inmunológico comprende un aceite de aceite mineral y bromuro de dimetildioctadecilamonio.
- 55 17. El uso de la reivindicación 16, en donde el adyuvante inmunológico VSA3.
18. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11-17, en donde la composición comprende además uno o más antígenos de ECEH recombinantes o purificados seleccionados del grupo que consiste en EspA, EspB, EspD, Tir e íntimina.
- 60 19. El uso de la reivindicación 18, en donde EspA + Tir comprenden al menos el 20% de la proteína celular presente en la composición.
- 65 20. Un sobrenadante de cultivo celular de ECEH, cultivado en medio mínimo M9 suplementado con NaHCO₃ 20-100 mM, MgSO₄ 5-10 mM, glucosa del 0,1-1,5% y casaminoácidos del 0,05-0,5%, en donde el sobrenadante de cultivo celular comprende una mezcla de antígenos secretados por un sistema de secreción de tipo III, y un

adyuvante inmunológico para su uso en reducir la colonización de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) en un rumiante.

- 5 21. Un sobrenadante de cultivo celular de ECEH, cultivado en medio mínimo M9 suplementado con NaHCO₃ 20-100 mM, MgSO₄ 5-10 mM, glucosa del 0,1-1,5% y casaminoácidos del 0,05-0,5%, en donde el sobrenadante de cultivo celular comprende una mezcla de antígenos secretados por un sistema de secreción de tipo III, y un adyuvante inmunológico en la fabricación de una composición para su uso en reducir la excreción de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) de un rumiante.
- 10 22. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en donde la composición de vacuna producida por el proceso de incubar un cultivo celular de ECEH en medio que comprende medio mínimo M9 suplementado con casaminoácidos al 0,1%, glucosa al 0,4%, MgSO₄ 8 mM y NaHCO₃ 44 mM, y combinar el sobrenadante del cultivo celular con un adyuvante inmunológico.
- 15 23. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en donde el sobrenadante del cultivo celular se obtiene del cultivo de uno o más serotipos de ECEH y se combina con un adyuvante inmunológico.
- 20 24. La composición de vacuna según la reivindicación 23, en donde el uno o más serotipos de ECEH se seleccionan del grupo que consiste en O157, O158, O5, O8, O18, O26, O45, O48, O52, O55, O75, O76, O78, O84, O91, O103, O104, O111, O113, O114, O116, O118, O119, O121, O125, O28, O145, O146, O163 y O165.
- 25 25. Un método de producir una composición de vacuna que comprende:
- 25 a) incubar un cultivo celular de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) en medio que comprende medio mínimo M9 suplementado con NaHCO₃ 20-100 mM, MgSO₄ 5-10 mM, glucosa del 0,1-0,5% y casaminoácidos del 0,05-0,5%;
- 30 b) obtener un sobrenadante de cultivo celular de ECEH; y
- 30 c) combinar el sobrenadante del cultivo celular de ECEH con un adyuvante inmunológico para producir la composición de vacuna.
26. El método de la reivindicación 25, en donde el medio mínimo M9 está suplementado con casaminoácidos al 0,1%, glucosa al 0,4%, MgSO₄ 8 mM y NaHCO₃ 44 mM.
- 35 27. El método de la reivindicación 25 o la reivindicación 26 en donde el sobrenadante del cultivo celular de ECEH se concentra.
28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 25-27 en donde el sobrenadante del cultivo celular de ECEH se obtiene del cultivo de uno o más serotipos de ECEH.
- 40 29. El método de la reivindicación 28 en donde el uno o más serotipos de ECEH se seleccionan del grupo que consiste en O157, O158, O5, O8, O18, O26, O45, O48, O52, O55, O75, O76, O78, O84, O91, O103, O104, O111, O113, O114, O116, O118, O119, O121, O125, O28, O145, O146, O163 y O165.

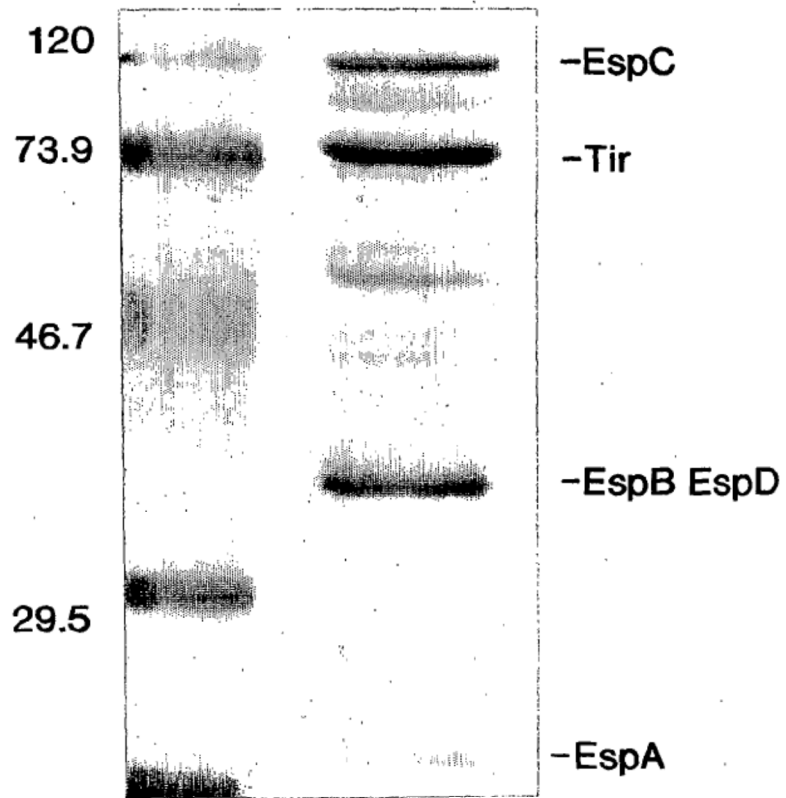


FIG. 1

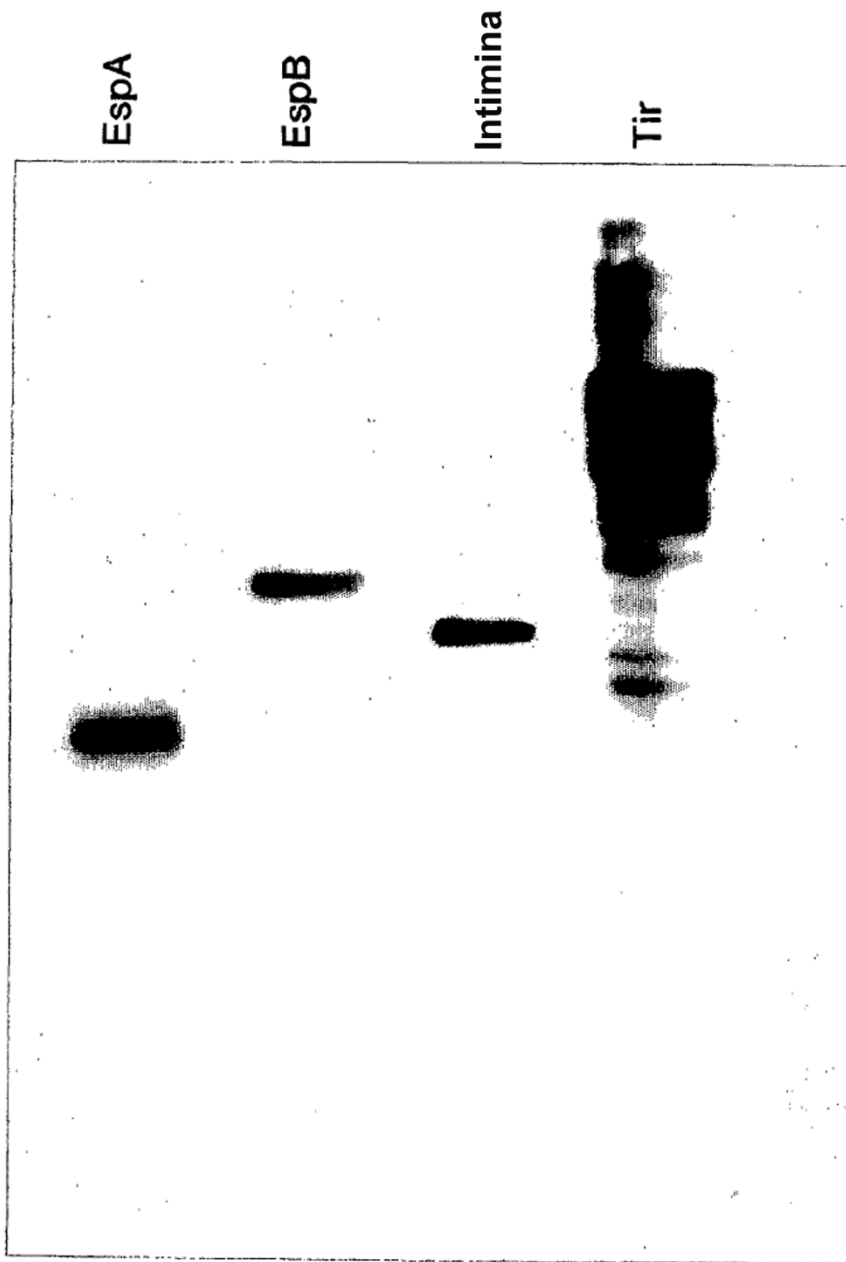


FIG. 2

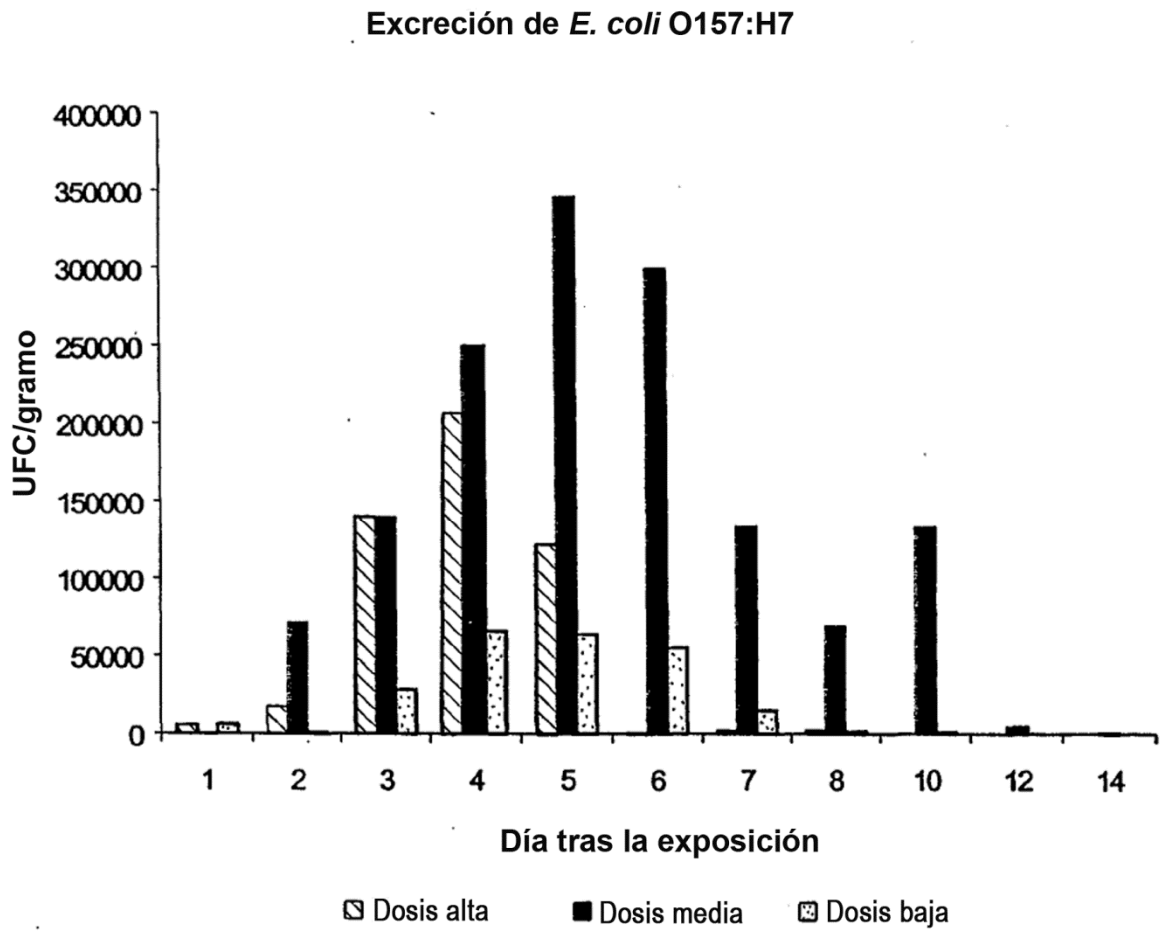


FIG. 3

Reactivación de la excreción de *E. coli* O157:H7

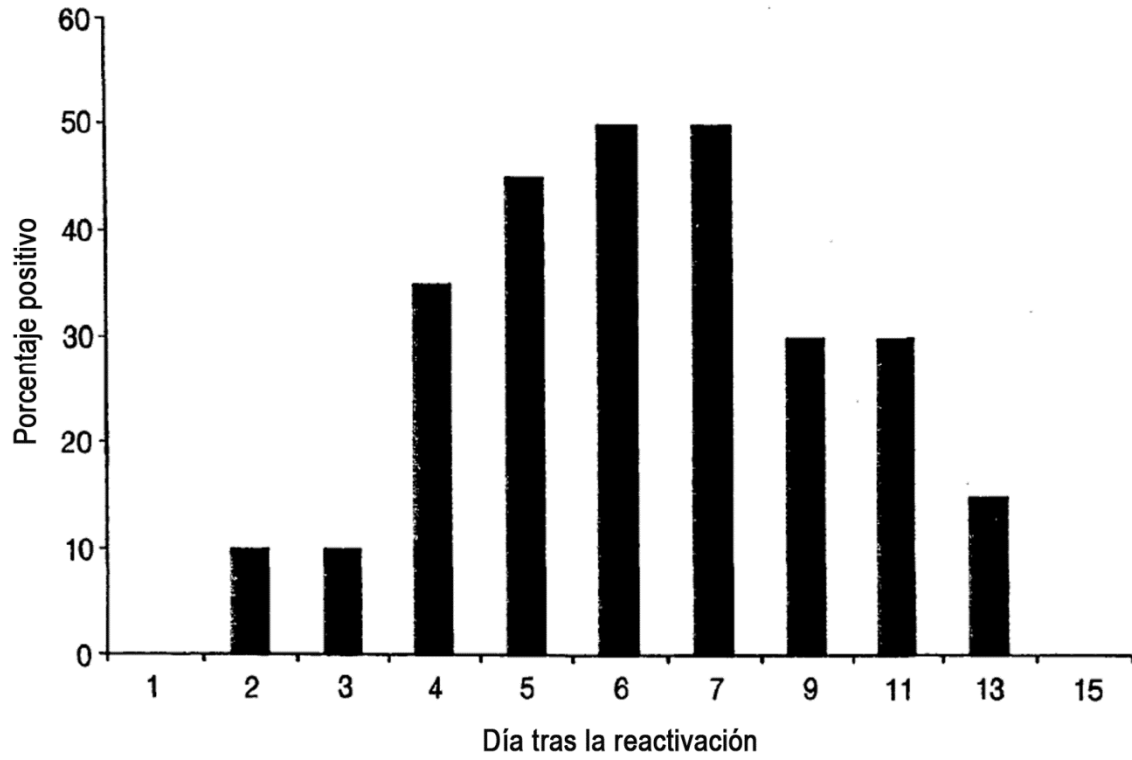


FIG. 4

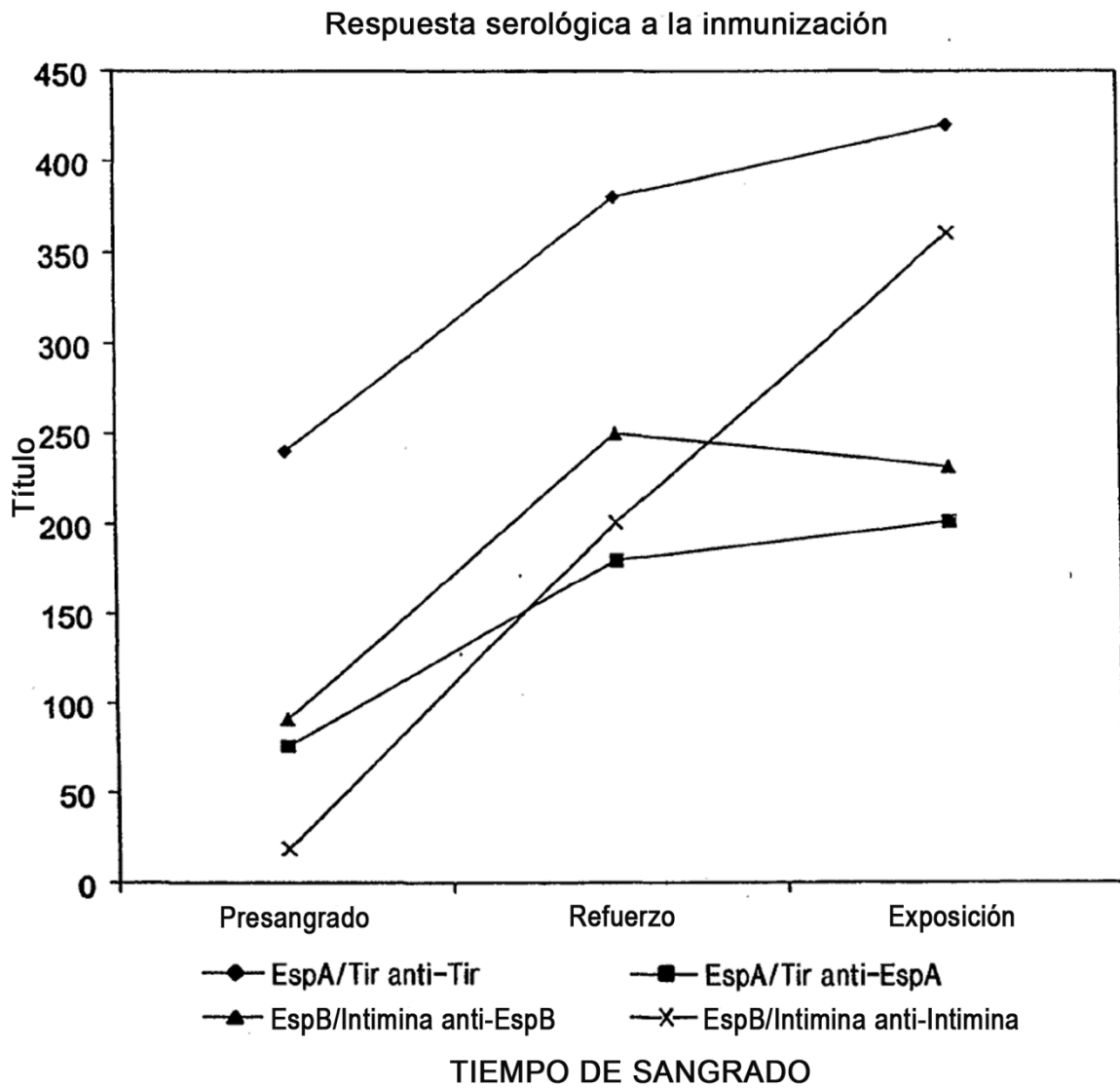


FIG. 5

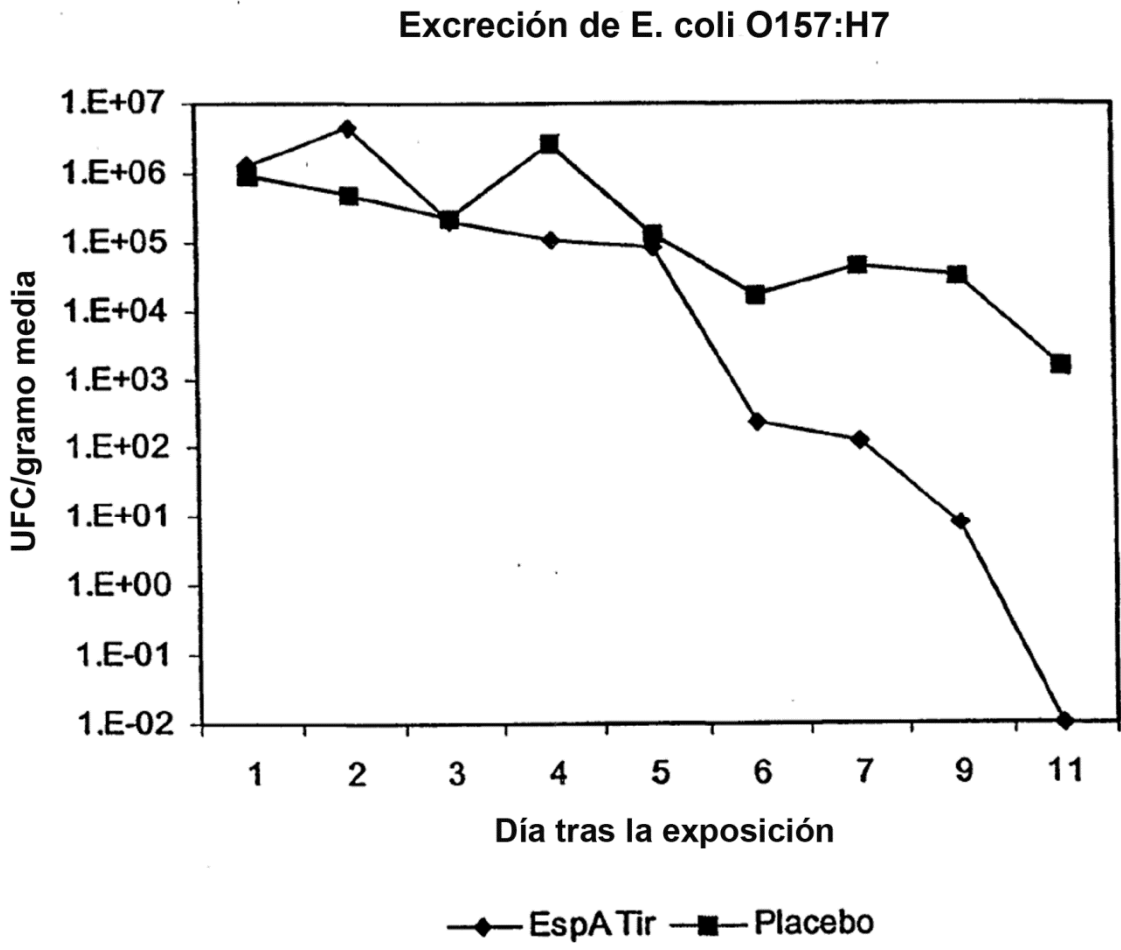


FIG. 6

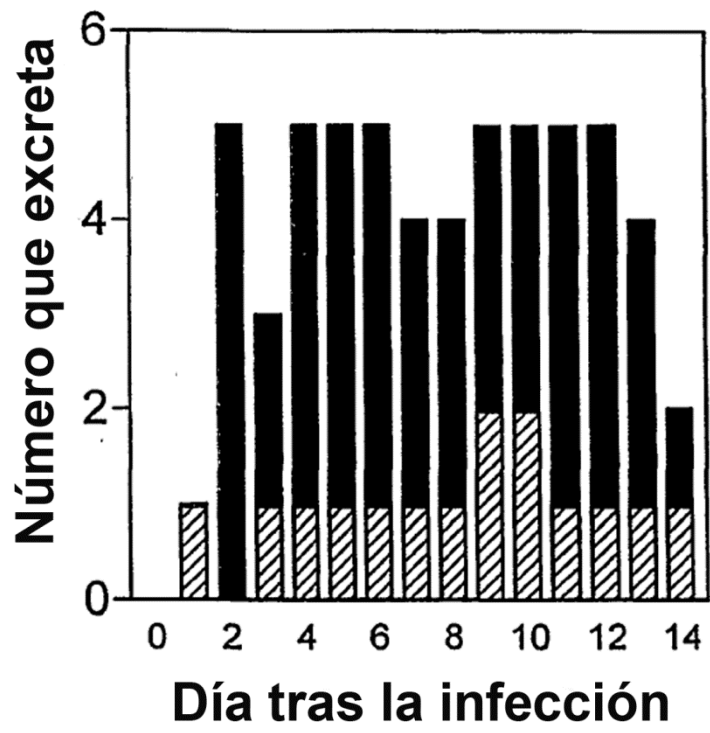


FIG. 7

FIG. 8A

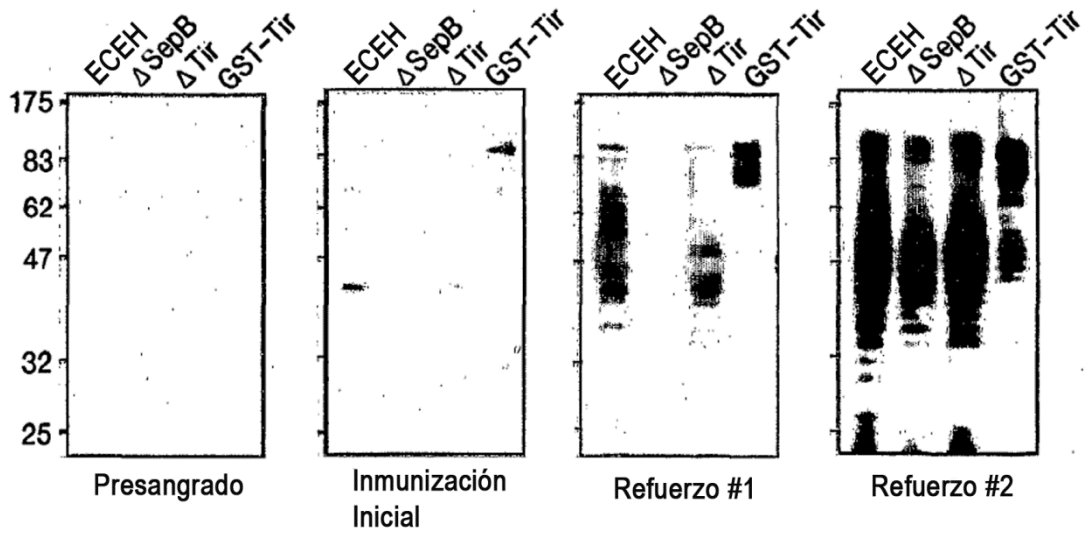
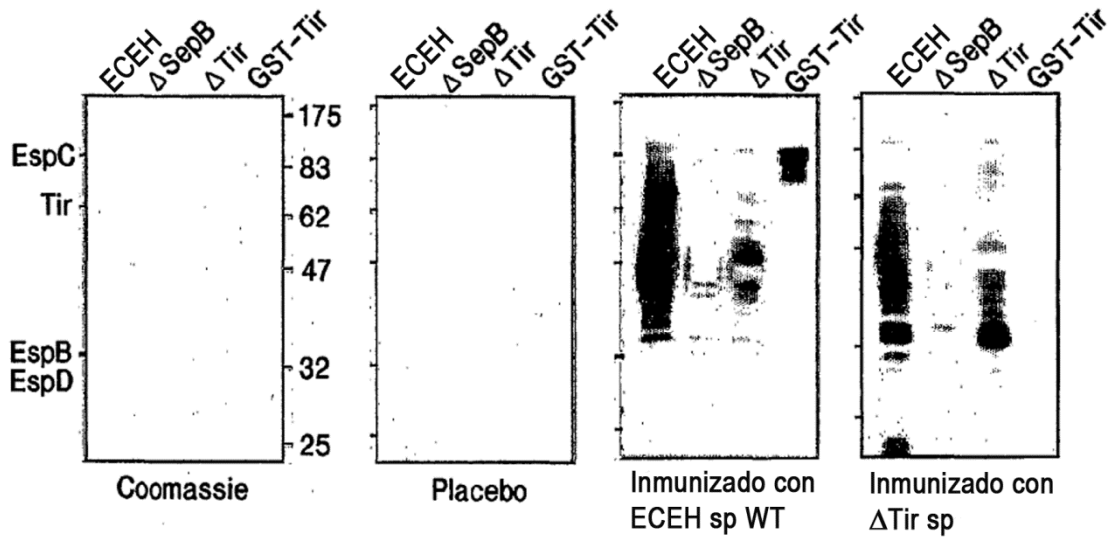


FIG. 8B

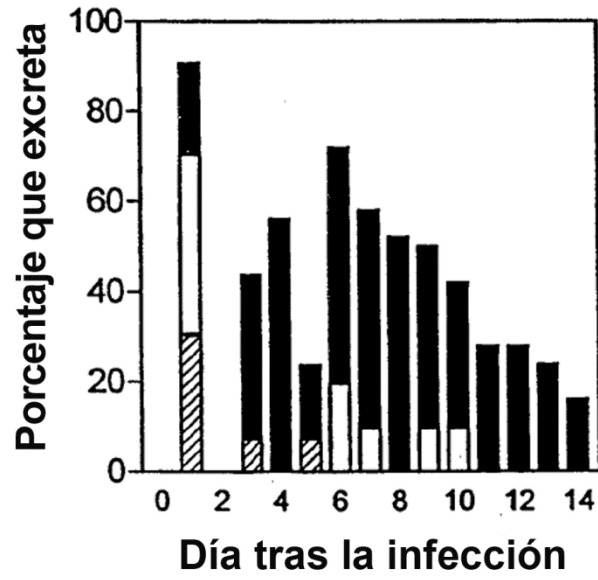


FIG. 9A

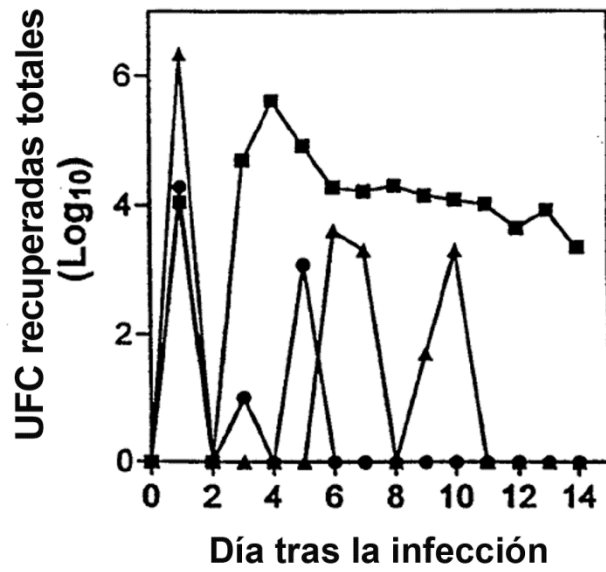


FIG. 9B