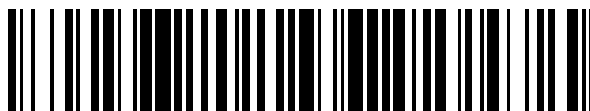


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 985**

51 Int. Cl.:

C07K 14/245 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/108 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2007 E 07751283 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1991565**

54 Título: **Proteínas quiméricas de toxoide de Shiga**

30 Prioridad:

16.02.2006 US 773658 P

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

06.04.2015

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (100.0%)
6720-A Rockledge Drive, Suite 100
Bethesda, MD 20817, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, MICHAEL J.;
O'BRIEN, ALISON D.;
TEEL, LOUISE D. y
MELTON-CELSA, ANGELA R.**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 532 985 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

Proteínas quiméricas de toxoide de Shiga

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un toxoide de Shiga quimérico, que se puede usar para vacunar contra las toxinas de Shiga.

10 Reconocimiento del apoyo federal

[0002] Esta presente invención surgió en parte a partir de la investigación financiada por la subvención federal NIH AI20148- 23.

15 Antecedentes de la invención

[0003] En Estados Unidos, *Escherichia coli* que produce toxina de Shiga (Stx) (STEC) es la causa más común de diarrea con sangre infecciosa (Rangel *et al.* (2005) *Emerg. Infect. Dis.* 11, 603-9) y registra aproximadamente 110.000 infecciones por año (Mead *et al.* (1999) *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607-25). La mayoría de las enfermedades mediadas por Stx son atribuibles a un subconjunto de STEC, el *E. coli* enterohemorrágico, que incluye el serotipo prototípico O157:H7. El síndrome urémico hemolítico (HUS) es una secuela seria de STEC (particularmente la infección O157:H7 que se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia trómbica e insuficiencia renal, especialmente entre los pacientes más vulnerables, niños y ancianos. El índice de fatalidad en los que sufren HUS es de cinco a diez por ciento, con potencial para daño de riñón y neurológico residual entre los supervivientes. La terapia para infecciones por STEC incluye cuidado de apoyo, rehidratación y diálisis de riñón (Andreoli *et al.* (2002) *Pediatr. Nephrol.* 17, 293-8; Klein *et al.* (2002) *J. Pediatr.* 141, 172-7; y Tarr *et al.* (2005) *Lancet* 365(9464), 1073-86). Actualmente no existe ninguna terapia intervencional o vacuna. Además, el tratamiento antibiótico está contraindicado debido al riesgo aumentado de HUS (Wong *et al.* (2000) *N. Engl. J. Med.* 342, 1930-6) que puede ser provocado por inducción del ciclo lítico de los fagos de conversión de toxina que codifican Stxs en el *E. coli*.

[0004] Hay dos tipos principales de Stxs. Los elementos del primer tipo, Stx producida por *S. dysenteriae* tipo 1 y Stx1 producida por *E. coli*, son prácticamente idénticos. El segundo tipo, Stx2 es también codificado por *E. coli*, no obstante, no se realiza la neutralización cruzada por antisueros policlonales contra Stx1, o viceversa (O'Brien *et al.* (1984) *Science* 226(4675), 694-6). Variantes de cada serogrupo de Stx existen (por ejemplo, Stx1c, Stx1d, Stx2c, Stx2d, Stx2d-activatable, Stx2e, Stx2f) (Melton-Celsa *et al.* (2005) *EcoSal-Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ASM Press, Chapter 8.7.8) pero permanecen neutralizables por sueros policlonales a la toxina prototipo (Schmitt *et al.* (1991) *Infect Immun* 59, 1065-73; Lindgren *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 62, 623-31). Stxs son holotoxinas complejas con una composición AB5. Tienen una subunidad enzimáticamente activa (A) y un dominio de unión (B) compuesto por cinco proteínas B idénticas de aproximadamente 7,7 kDa cada una que forman un pentámero. La subunidad A es una proteína de ~32 kDa, es decir asimétricamente dividida por tripsina o furina en la subunidad A1 (aproximadamente 27 kDa) y el péptido A2 (aproximadamente 5 kDa) que permanecen asociados a través de un enlace bisulfuro. Las subunidades A y B maduras de Stx1 y Stx2 tienen 55 % y 61 % de identidad y 68 % y 73 % de similitud, respectivamente. A pesar de las diferencias de secuencia de los aminoácidos, las estructuras de cristal de la holotoxinas son notablemente similares (Fraser *et al.* (1994) *Nat. Struct. Biol.* 1, 59-64; Fraser *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 27511- 7) y las toxinas tienen el mismo modo de acción. La subunidad A1 contiene la región enzimáticamente activa, una N-glicosidasa que retira un residuo de adenosina del ARNr 28S del ribosoma 60S. Esta alteración detiene la síntesis de proteína y mata la célula intoxicada. El péptido A2 atraviesa el pentámero B para fijar la holotoxina de manera no covalente. El pentámero B se enlaza con la ceramida de globotriaosil del receptor eucariota (Gb3) o Gb4, como es el caso para Stx2e.

[0005] Esfuerzos para desarrollar vacunas que protejan contra ambos tipos de Stx han fracasado hasta ahora. Las Stxs son extremadamente potentes y la inactivación de la actividad enzimática es necesaria para utilizar la holotoxinas como vacunas. Una alternativa es usar las subunidades B para suscitar anticuerpos que bloqueen la unión del pentámero B con el receptor celular GB3. Este método ha tenido éxito con StxB1 para elevar la protección contra la inoculación de Stx1, pero la inmunización con la subunidad StxB2 es inefectiva para proteger contra Stx2. Además, la inmunización pasiva de ratones con anticuerpo monoclonal anti-StxA2 protege a los ratones de los efectos de infección con cepas productoras de Stx2 mientras que el anticuerpo monoclonal anti-StxB1 no protege contra tal inoculación (Wadolowski *et al.* (1990) *Infect. Immun.* 58, 2438-45; Lindgren *et al.* (1993) *Infect. Immun.* 61, 3832-42). No obstante, los ratones inyectados con una dosis por otro lado letal de Stx1 o Stx2 están protegidos por inmunización pasiva con anti-StxB1 o anti-StxA2, respectivamente. La toxicidad de las subunidades StxA se suprime en gran medida sin el dominio de unión al pentámero B y existen pruebas de que las vacunas compuestas por StxA1 y StxA2 ofrecen protección para toxina homóloga en conejos (Bielaszewska *et al.* (1997) *Infect. Immun.* 65, 2509-16). No obstante, por seguridad, la inactivación de la actividad enzimática sería necesaria para su uso para una vacuna de subunidad A en seres humanos. Las vacunas de subunidad en general son menos deseables desde la perspectiva de que la holotoxina es posible que proporcione un espectro más amplio de anticuerpos protectores que una vacuna de subunidad.

[0006] La protección contra las enfermedades mediadas por toxina por inmunización con vacunas de toxoide (holotoxina inactivada) funciona para el tétanos y la difteria. Desafortunadamente, la inactivación química de Stxs con formaldehído o glutaraldehído es un procedimiento químico mal definido que puede provocar toxicidad residual (Metz *et al.* (2003) *Vaccine* 22, 156-67; Gordon *et al.* (1992) *Infect. Immun.* 60, 485- 90) o distorsión potencial de la estructura de la holotoxina nativa de manera que los anticuerpos de neutralización no sean generados o sean de graduación baja. Algunos informes de la bibliografía sugieren que la neutralización cruzada se ha conseguido en animales vacunados con toxoides de Shiga químicamente preparados (Bielaszewska *et al.* (1997) *Infect. Immun.* 65, 2509-16; Ludwig *et al.* (2002) *Can. J. Microbiol.* 48, 99-103); no obstante, el potencial para toxicidad que amenace la vida de tal vacuna excluye el uso de toxoides Stx químicos en seres humanos. Una alternativa más segura para los toxoides de Stx químicamente derivados es la construcción de toxoides genéticos a través de la introducción de mutaciones específicas en los genes de la subunidad A de Stx para cambiar los aminoácidos clave del dominio enzimáticamente activo. Toxinas Stx1 y Stx2 híbridas se han creado para estudios funcionales de Stxs (Head *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 3617-3621; Weinstein *et al.* (1989) *Infect. Immun.* 57, 3743-50; Melton-Celsa *et al.* (2002) *Molecular Microbiology* 43, 207-215), incluyendo fusiones de operón que permiten la expresión de la subunidad A y B como un único operón (Weinstein *et al.*, *supra*). Toxoides genéticos de Stx1 o Stx2 que protegen a los animales de inoculaciones letales posteriores de Stx1 o Stx2 se han realizado previamente (Gordon *et al.* (1992) *Infect. Immun.* 60, 485-90; Ishikawa *et al.* (2003) *Infect. Immun.* 71, 3235-9; Wen *et al.* (2006) *Vaccine* 24, 1142-8). No obstante, tales toxoides genéticos son incapaces de eludir la falta de neutralización cruzada entre los serogrupos Stx1 y Stx2 y solo proteger contra el grupo de Stx a partir del cual se hicieron. Hasta la fecha, no se ha informado en la bibliografía de la generación de toxoides híbridos de Stx.

Resumen de la invención

[0007] La invención abarca una proteína quimérica que comprende al menos un polipéptido de StxA con una o más modificaciones en uno o más sitios activos tal y como se define en la reivindicación 1, y al menos un polipéptido de StxB. En algunos aspectos que aquí se describen, la proteína quimérica existe como un pentámero. En otros aspectos, el polipéptido de StxB o fragmento del mismo comprende una o más modificaciones donde la o las modificaciones son una sustitución, adición y/o delección de aminoácidos. En algunos aspectos, la sustitución es una sustitución de aminoácidos conservadora. En otros aspectos, el polipéptido de StxA es StxA2 o un fragmento del mismo y/o el polipéptido de StxB es StxB1 o un fragmento del mismo. En otro aspecto, la proteína comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2 y/o 3. Las proteínas quiméricas de la invención comprenden una sustitución en cada residuo de aminoácidos en el polipéptido Stx2A que se corresponde con el residuo 77, 167 y 170. En algunas formas de realización, la modificación en el residuo 77 es la sustitución de un residuo de serina mientras que la modificación en el residuo 167 es la sustitución de un glutamina, asparagina u otro residuo de aminoácido y la modificación en el residuo 170 es la sustitución de un residuo de leucina. La modificación es capaz de reducir o eliminar la actividad enzimática del polipéptido de Stx2A como se describe en este caso. En otros aspectos, las modificaciones hacen la proteína no tóxica para los mamíferos.

[0008] La divulgación también abarca un anticuerpo aislado que enlaza con las proteínas de toxoide quimérico de la invención y como se describe en este caso. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. La invención también abarca una composición que comprende una o varias de cualquiera de las proteínas de toxoide quiméricas de la invención como se describe en este caso. En algunos aspectos, la proteína quimérica es capaz de inducir una respuesta inmunogénica, incluyendo, pero no limitado a, una respuesta inmunogénica para la toxina Shiga. En algunos aspectos, la composición comprende además uno o varios portadores farmacéuticamente aceptables y/o adyuvante(s). En otro aspecto, la composición es adecuada para su administración a un humano.

[0009] La invención además abarca una molécula de ácido nucleico aislado que codifica las proteínas de toxoide quiméricas de la invención como se reivindica. En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico aislado codifica una secuencia de aminoácidos que comprende SEC ID n°: 2 y/o 3. En formas de realización adicionales, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID n°: 1. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos muestra al menos 90%, 95% o incluso hasta 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos contigua de SEC ID n°: 1 y codifica un polipéptido que es capaz de inducir una respuesta inmunogénica para Stx.

[0010] La invención también abarca una célula huésped transformada para contener los ácidos nucleicos de la invención como se describe en este caso e incluye un vector que comprende los ácidos nucleicos aislados. La invención también incluye una célula huésped que comprende el vector ya mencionado. En algunas formas de realización, el huésped se selecciona del grupo que consiste en huéspedes eucarióticos y procarióticos. La invención además abarca un método para producir un polipéptido que comprende el cultivo de una célula huésped transformada con la molécula de ácido nucleico de la invención bajo condiciones donde la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico se expresa.

[0011] La divulgación incluye un método de generación de anticuerpos capaces de unión a Stx que comprende la administración de una proteína de toxoide quimérica de la invención como se describe en este caso a un mamífero o cultivo celular. La divulgación además incluye un método de generación de anticuerpos capaces de unión a Stx que comprende la administración de la composición incluyendo las proteínas de toxoide quiméricas de la invención a un mamífero. En algunas formas de realización, el mamífero es un humano. En formas de realización adicionales, el humano sufre diarrea y/o síndrome urémico hemolítico.

[0012] La invención también abarca el uso de una proteína quimérica como se reivindica en un método de prevención del síndrome urémico hemolítico en un humano que comprende la administración de una composición que incluye las proteínas de toxoide quiméricas de la invención. La invención abarca el uso de una proteína quimérica tal y como se reivindica en un método de prevención de la diarrea asociada a infección de *Escherichia coli* productor de toxina de Shiga en un humano que comprende la administración de la composición anteriormente mencionada. La divulgación también incluye un producido de anticuerpo aislado por cualquiera de estos métodos y un equipo que comprende este anticuerpo. En algunos aspectos, el equipo comprende además una o varias proteínas de toxoide quiméricas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

[0013]

Figura 1: análisis de Western blot de toxoide quimérico StxA2/StxB1. Toxoide de tipo salvaje Stx1, Stx2 y quimérico StxA2/StxB1 (300 ng cada uno) se separaron en un 15% de gel de SDS-poliacrilamida y se evaluaron con sobrenadantes de hibridoma de anticuerpo monoclonal (MAb) dirigidos contra StxB1 y StxA2 (13C4 y 11E10 MAbs, respectivamente). La línea 1 contiene Stx1, la línea 2 contiene Stx2 y la línea 3 contiene el toxoide StxA2/StxB1.

Figura 2: detección de anticuerpos anti-Stx1 o anti-Stx2 por ELISA. Títulos de IgG en suero para Stx1 (izquierda) o Stx2 (derecha) de ratones inmunizados con PBS (grupos A y C) o el toxoide StxA2/StxB1 (grupos B, D y E) se muestran en la figura 2. Las barras horizontales representan la media geométrica del logaritmo del título de IgG en suero para Stx1 o Stx2 y las barras de error indican \pm una desviación típica. Los círculos ensombrecidos en grupos E representan el ratón que murió cuando fue inoculado con Stx1 y Stx2. La línea discontinua representa el límite de detección.

Figura 3: ensayos de neutralización de toxina Stx1 y Stx2 *in vitro*. Títulos de neutralización *in vitro* para Stx1 (izquierda) y Stx2 (derecha) con antisueros de ratones inmunizada con bien PBS (grupos A y C) o el toxoide StxA2/StxB1 (grupos B, D y E) se muestran en la figura 3. Las barras horizontales representan la media geométrica del logaritmo del título de neutralización para Stx1 o Stx2, y las barras de error indican \pm una desviación típica. La cantidad de Stx1 y Stx2 usada fue de 20 y 38 50% dosis citotóxicas (CD50), respectivamente. El círculo ensombrecido de los grupos E representa el ratón que murió cuando fue inoculado con Stx1 y Stx2. La línea discontinua representa el límite de detección.

Descripción detallada

[0014] Un objetivo de inmunización contra Stx y síndrome urémico hemolítico (HUS) es inducir respuestas de anticuerpo neutralizantes (NA) ampliamente reactivas contra los múltiples tipos de Stxs, incluyendo pero no limitado a, Stx 1 y 2 y variantes de Stx1 y Stx2. Los presentes inventores han estudiado el *E. coli* productor de Stx (STEC) y determinado que la creación de un toxoide de Shiga quimérico con modificaciones a uno o varios sitios de este toxoide híbrido induce la producción de especies con amplia reacción cruzada de anticuerpos contra Stx tras la inmunización. La invención por lo tanto abarca toxoides de Shiga quiméricos, métodos de uso y composiciones. Como se utiliza en este caso "toxoides" se refiere a una holotoxina inactivada. Como se utiliza en este caso "subunidad StxA2 enzimáticamente inactivada" se refiere a una subunidad StxA2 que ha perdido su funcionalidad a través de mutaciones tales como por ejemplo, sustituciones, adiciones y/o deleciones.

Proteínas quiméricas de toxoide de Shiga y método de uso

[0015] La invención abarca una proteína de toxoide de Shiga quimérica que contiene una subunidad S1xA2 inactivada enzimáticamente y la subunidad StxB1 nativa. La subunidad StxA2 es inactivada en más sitios en combinación por mutagénesis dirigida al sitio. Los aminoácidos son sustituidos. Sin importar la deleción o deleciones y/o sustitución o sustituciones, la conformación de la subunidad StxA2 permanece suficientemente intacta para inducir anticuerpos a múltiples subunidades de Stxs tras la administración a un mamífero. Mamíferos, incluyendo pero no limitado a seres humanos y/o ratones que son inmunizados con este toxoide quimérico modificado desarrollan una respuesta inmune, que reducirá o bloqueará HUS u otros efectos de infección por STEC o intoxicación con Stx.

[0016] Sitios de sustitución en la proteína StxA2 incluyen, pero de forma no limitativa, aminoácidos en StxA2 correspondientes a los residuos 77, 167 y 170 de SEC ID n°: 2. Las sustituciones pueden ser Y77S, E167Q y R170L o equivalentes. En una forma de realización de la invención, la invención abarca secuencias de aminoácidos como aparecen en SEC ID n°: 2 y 3 y fragmentos de las mismas. En otra forma de realización de la invención, la invención abarca un toxoide de Shiga quimérico que contiene una subunidad StxA2 inactivada enzimáticamente y la subunidad StxB1 nativa de las secuencias de aminoácidos como aparecen en SEC ID n°: 2 y/o 3 y fragmentos de las mismas.

[0017] En algunas formas de realización de la divulgación, la subunidad StxB1 no enlaza o tiene unión limitada con el receptor GB3 pero es capaz de evocar una respuesta de anticuerpo de protección. La invención incluye polipéptidos

quiméricos y sales derivadas, que comprenden al menos una proteína de toxoide de Shiga y al menos un segundo polipéptido. En algunas formas de realización, el segundo polipéptido incluye un segundo tipo de Stx.

5 [0018] El segundo polipéptido puede también incluir un dominio de estabilización, que aumenta la vida media *in vitro* e *in vivo* del polipéptido de fusión. Como se utiliza en este caso, el término "dominio de estabilización" se refiere a una secuencia de aminoácidos capaz de extender la vida media *in vitro* e *in vivo* de un toxoide de Shiga cuando se compara con el toxoide de Shiga solo. El dominio de estabilización puede comprender proteínas humanas (por ejemplo, proteínas solubles de longitud total o truncadas a partir de fragmentos extracelulares, etc.) tal como albúmina de suero humano, transferrina u otras proteínas, que estabilizan el vida media *in vivo* o *in vitro* de la proteína de toxoide quimérica. Estos dominios funcionales adicionales pueden servir ellos mismos como péptidos enlazadores, por ejemplo, para unir un toxoide de Shiga a una segunda proteína. Alternativamente, se pueden localizar en otro lugar de la molécula de fusión (por ejemplo, en el amino o carboxi terminal de la misma). En formas de realización alternativas, el dominio de estabilización es una fracción química (por ejemplo, PEG (polietilenglicol) o un dextrano).

15 [0019] El término "quimérico" o "polipéptido de fusión", como se utiliza en este caso, se refiere a polipéptidos en los que: (i) un dominio funcional dado (es decir, un toxoide de Shiga) se liga a su carboxi terminal por un enlace no covalente bien al amino terminal de una segunda proteína (es decir, un segundo toxoide de Shiga) o a un péptido de enlace que él mismo está ligado por un enlace no covalente al amino terminal de la segunda proteína; (ii) un dominio funcional dado (es decir, un toxoide de Shiga) se liga a su amino terminal por un enlace no covalente bien al carboxi terminal de una segunda proteína (es decir, un segundo toxoide de Shiga) o a un péptido enlazador que él mismo está ligado por un enlace no covalente al carboxi terminal de la segunda proteína; y/o (iii) las Stxs existen como holotoxinas complejas con una composición AB5 como se describe en este caso y con una subunidad (A) enzimáticamente activa y un dominio de unión (B) compuesto por cinco proteínas B idénticas que forman un pentámero.

25 [0020] De forma similar, "fusionado" cuando se usa en relación con los productos intermedios de ácido nucleico de la invención significa que el 3'- [o 5'-] terminal de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína está ligado al respectivo 3'- [o 5'-] terminal de una secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína, bien por un enlace covalente o indirectamente a través de un enlazador de nucleótidos que él mismo está enlazado de manera covalente preferiblemente en sus terminales al primer polinucleótido que codifica el dominio funcional y opcionalmente, un ácido nucleico que codifica un segundo dominio funcional.

[0021] Ejemplos de polipéptidos quiméricos o de fusión de la invención se pueden representar, pero no están limitados por las siguientes fórmulas:

35 R1-L-R2 (i)
R2-L-R1 (ii)
40 R1-L-R2-L-R1 (iii)
R1-L-R1-L-R2 (iv)
45 R2-L-R1-L-R1 (iv)

donde R1 es la secuencia de aminoácidos de un primer toxoide de Shiga, R2 es la secuencia de aminoácidos de un segundo toxoide de Shiga o un dominio estabilizante (por ejemplo, albúmina de suero humano), cada L es un péptido enlazador que se liga por un enlace covalente a un terminal de R1 y/o R2, por lo cual los fragmentos de molécula anteriores son leídos de forma direccional (es decir, la parte izquierda corresponde al amino terminal y la derecha al carboxi terminal de la molécula). En otra forma de realización, toda o parte de una proteína de intimina (Carvalho *et al.* (2005) Infect. Immun. 73, 2541-2546), que incluye el dominio de unión a la intimina (carboxi terminal), es R1 y R2 es la proteína de toxoide quimérica.

Moléculas de ácido nucleico y métodos de uso

55 [0022] La presente invención proporciona además moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de toxoide de Shiga quiméricas de la invención incluyendo una proteína quimérica con una subunidad StxA2 inactivada enzimáticamente y la subunidad StxB1 nativa, preferiblemente en la forma aislada. Como se utiliza en este caso, "ácido nucleico" se define como ARN o ADN que codifica una proteína o péptido tal y como se ha definido anteriormente, es complementario de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica tales péptidos, hibridiza para las moléculas de ácido nucleico que codifican una subunidad StxA2 inactivada enzimáticamente y la subunidad StxB1 nativa a través del marco de lectura abierto bajo condiciones de astringencia apropiadas o codifica un polipéptido que comparte al menos aproximadamente 65% de identidad con StxA2 inactivada y aproximadamente 91% de identidad con StxB1, alternativamente al menos aproximadamente 90% de identidad con StxA2 inactivada y aproximadamente 91% de identidad con StxB1, alternativamente al menos aproximadamente 99% de identidad con StxA2 inactivada y

aproximadamente 95% de identidad con StxB1, alternativamente al menos 99,4% de identidad con StxA2 inactivada y aproximadamente 99% de identidad con StxB1.

5 [0023] Los ácidos nucleicos de la invención incluyen además moléculas de ácido nucleico que comparten al menos aproximadamente 90%, alternativamente al menos aproximadamente 95%, alternativamente al menos aproximadamente 98%, alternativamente al menos aproximadamente 99% o más de identidad con la secuencia de nucleótidos contigua de las moléculas de ácido nucleico que codifican el toxoide de Shiga químérico que contiene una subunidad StxA2 inactivada enzimáticamente y la subunidad StxB1 nativa incluyendo SEC ID n°: 2 y/o 3.

10 [0024] En algunas formas de realización de la invención, las moléculas de ácido nucleico contienen sustituciones de base doble o triple en la región de codificación para el gen StxA22 en codones que codifican sitios de sustitución adecuados tales como, por ejemplo, en los codones que codifican residuos de aminoácidos 77, 167 y 170 de la proteína StxA2 (SEC ID n°: 2).

15 [0025] En otra forma de realización, las moléculas de ácido nucleico contienen modificaciones (por ejemplo, sustituciones, adiciones y/o deleciones) en la región de codificación para el gen StxB1 que evitan que la proteína StxB1 interactúe con las células de riñón (a través de, por ejemplo, el receptor GB3 de la célula huésped). En una forma de realización, tal modificación está en uno o más codones que codifican los residuos de aminoácidos 16 y/o 17 de la proteína StxB1. Estas modificaciones puede dar lugar a sustituciones de aminoácidos de D16H y D17H o equivalentes.
 20 En otra forma de realización, tal modificación está en uno o más codones que codifican los residuos de aminoácidos 33, 43 y/o 60 de la proteína StxB1. Estas modificaciones puede dar lugar a sustituciones de aminoácidos de R33C, A43T y G60D o equivalentes. En otra forma de realización, tal modificación está en uno o más codones que codifican los residuos de los aminoácidos 16 y/o 17 de StxB1 y en uno o más codones que codifican los residuos de los aminoácidos 33, 43 y/o 60 de la proteína StxB1. Estas modificaciones puede dar lugar a sustituciones de aminoácidos de D16H y
 25 D17H o equivalentes y sustituciones de aminoácidos de R33C, A43T y G60D o equivalentes.

[0026] Se contemplan específicamente el ADN, ADNc, ARNm genómico y moléculas antisentido, al igual que ácidos nucleicos basados en estructuras alternativas, o incluyendo bases alternativas, si se derivan de fuentes naturales o sintetizadas. Tales ácidos nucleicos, no obstante, son definidos además como nuevos y no evidentes sobre cualquier
 30 ácido nucleico del estado de la técnica incluyendo el que codifica, hibridiza bajo condiciones de astringencia apropiadas, o es complementario del ácido nucleico que codifica una proteína según la presente invención. La homología o la identidad en nivel del nucleótido o de la secuencia de aminoácidos se determina por análisis con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, herramienta de búsqueda de alineación local básica), que utiliza el algoritmo empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402 and Karlin *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2264-2268), que están adaptados para la búsqueda de similitud de secuencia. El método usado para el programa BLAST es considerar primero segmentos similares, con y sin espacios, entre una secuencia de consulta y una secuencia de base de datos, luego evaluar el significado estadístico de todas las coincidencias que se identifican y finalmente resumir solo las coincidencias que satisfagan un umbral preseleccionado de importancia. Para una discusión de salidas básicas en la búsqueda de similitud de bases de datos de secuencia,
 40 véase Altschul *et al.* (1994) *Nature Genetics* 6, 119-129. Los parámetros de búsqueda para histograma, descripciones, alineaciones, espera (es decir, el umbral de importancia estadística para reportar coincidencias contra las secuencias de base de datos), corte, matriz y filtro (baja complejidad) son los ajustes por defecto. La matriz de puntuación por defecto usada por blastp, blastx, tblastn y tblastx es la matriz BLOSUM62 (Henikoff *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915-10919), recomendada para secuencias de consulta de 85 de longitud (bases de nucleótidos).
 45

[0027] Para blastn, la matriz de puntuación es establecida por las proporciones de M (es decir, la puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes) a N (es decir, la puntuación de penalización para residuos no coincidentes), donde los valores por defecto para M y N son +5 y -4, respectivamente. Cuatro parámetros de blastn se ajustaron de la siguiente manera: Q=10 (penalización por creación de espacio); R=10 (penalización por extensión de espacio); wink=1 (genera aciertos de palabra en cada posición de winkth a lo largo de la consulta); y gapw=16 (establece el ancho de ventana dentro de las que alineaciones espaciadas son generadas). Los ajustes de parámetros de Blastp equivalentes fueron Q=9; R=2; wink=1; y gapw=32. Una comparación de Bestfit entre secuencias, disponible en la versión del paquete GCG 10.0, usa parámetros de ADN GAP=50 (penalización por creación de espacio) y LEN=3 (penalización por extensión de espacio) y los ajustes equivalentes en las comparaciones de proteína son GAP=8 y
 50 LEN=2.
 55

[0028] "Condiciones astringentes" son las que (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, 0,015 M de NaCl/0,0015 M de citrato de sodio/0,1% de SDS de 50°C a 68°C o (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante tal como la formamida, por ejemplo, 50% (vol/vol) de formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1 % de Fico11/0,1% de polivinilpirrolidona/50 mM de tampón de fosfato sódico (pH 6,5) con 750 mM de NaCl, 75 mM de citrato sódico a 42°C. Otro ejemplo es la hibridación en 50% de formamida, 5x SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato sódico), 50 mM de fosfato sódico (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonido (50 pg/ml), 0,1% de SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2x SSC y 0,1% de SDS o 68°C en 0,1x SSC y 0,5% de SDS. Un experto en la materia puede determinar fácilmente y variar las condiciones de astringencia apropiadamente para obtener una señal de hibridación clara y detectable. Las moléculas preferidas son las que hibridan bajo las condiciones anteriores al
 60
 65

complemento de SEC ID nº: 1 y que codifican una proteína funcional. Las moléculas de hibridación incluso más preferidas son las que hibridan bajo las condiciones anteriores a la cadena de complemento del marco de lectura abierto del ácido nucleico que codifica el toxoide de Shiga quimérico que contiene una subunidad StxA2 inactivada enzimáticamente y la subunidad StxB1 nativa. Como se usa aquí, una molécula de ácido nucleico se dice que está "aislada" cuando la molécula de ácido nucleico está sustancialmente separada de moléculas de ácido nucleico contaminantes que codifican otros polipéptidos.

[0029] La molécula de ácido nucleico que codifica un toxoide de Shiga quimérico con una subunidad StxA2 inactivada enzimáticamente y la subunidad StxB1 nativa, son parte de un operón. Una forma de realización de la invención es una fusión de operón compuesta por un ácido nucleico que codifica una subunidad StxA2 inactivada enzimáticamente seguida de una molécula de ácido nucleico que codifica la región intergénica nativa StxB1 que contiene el sitio de unión ribosómico para traducción de StxB1 y luego una molécula de ácido nucleico que codifica StxB1 nativa.

[0030] La presente divulgación además proporciona fragmentos de la molécula de ácido nucleico codificante que contienen un toxoide de Shiga quimérico con una subunidad StxA2 inactivada enzimáticamente y la subunidad StxB1 nativa. Como se utiliza en este caso, un fragmento de una molécula de ácido nucleico de codificación se refiere a una parte pequeña de la secuencia codificante de la proteína entera. El tamaño del fragmento será determinado por el uso pretendido. Por ejemplo, fragmentos que codifican péptidos que corresponden a regiones antigénicas predichas se pueden preparar. Si el fragmento debe usarse como una sonda de ácido nucleico o cebador PCR, entonces la longitud de fragmento se elige para obtener un número relativamente pequeño de falsos positivos durante sondaje/cebado.

[0031] Fragmentos de las moléculas de ácido nucleico de codificación de la presente invención (es decir, oligonucleótidos sintéticos) que se utilizan para sintetizar secuencias génicas que codifican proteínas de la invención, pueden fácilmente ser sintetizados por técnicas químicas, por ejemplo, el método de fosfotriéster de Matteucci *et al.* (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191 o utilizando métodos de síntesis automatizada. Además, segmentos de ADN mayores se pueden preparar fácilmente mediante métodos bien conocidos, tales como síntesis de un grupo de oligonucleótidos que definen varios segmentos modulares del gen, seguidos de ligamiento de oligonucleótidos para construir el gen modificado completo. En una forma de realización, la molécula de ácido nucleico de la presente invención contiene un marco de lectura abierto contiguo de al menos aproximadamente 1.253 nucleótidos, esta secuencia empieza con la secuencia de Shine-Dalgarno optimizada y finaliza después del codón de terminación stxB1.

[0032] Las moléculas de ácido nucleico de codificación de la presente invención puede ser además modificadas para que contengan una etiqueta detectable para fines de diagnóstico y sonda. Las moléculas de ácido nucleico de codificación de la presente invención puede ser además modificadas para que contengan una etiqueta para aislamiento tal como por ejemplo, por adición de codones de repetición que modifican moléculas de histidina para su uso en, por ejemplo, purificación de afinidad de níquel. Una variedad de tales etiquetas se conocen en la técnica y se pueden utilizar fácilmente con las moléculas de codificación aquí descritas. Etiquetas adecuadas incluyen, pero de forma no limitativa, biotina, nucleótidos radiomarcados y similares. Un experto en la materia puede emplear fácilmente cualquier marcador tal para obtener variantes marcadas de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Modificaciones en la estructura primaria en sí por delección, adición o alteración de los aminoácidos incorporados en la secuencia de proteína durante la traducción se pueden hacer sin destruir la actividad de la proteína.

[0033] En una forma de realización, una etiqueta de seis histidinas se añade al C-término de la proteína StxB1 nativa o ligeramente modificada para ayudar a la purificación del toxoide StxA2/StxB1 mediante, por ejemplo, métodos de afinidad de níquel. En otra forma de realización, una etiqueta de seis histidinas se añade al C-término de la proteína StxB1 nativa o ligeramente modificada y la etiqueta de seis histidinas se añade también a la proteína StxA2. La etiqueta de histidina en la proteína StxA2 se puede localizar en la proximidad inmediata de dos histidinas presentes en las posiciones 244 y 245 de StxA2. La etiqueta de histidina se puede adicionar creando hasta cuatro cambios de aminoácidos en la proteína StxA2 tal como por ejemplo, Q246H, G247H, A248H y R249H. Ventajosamente, el etiquetado individual de las subunidades StxA2 y StxB1 permite mejor purificación de las subunidades utilizando intercambio iónico y procedimientos de purificaciones de exclusión por tamaño conjuntamente con la purificación de columna de afinidad de níquel.

Ácidos nucleicos recombinantes y métodos de uso

[0034] La presente invención además proporciona moléculas de ácido nucleico recombinantes (por ejemplo, ADN, ARN) que contienen una secuencia codificante para una subunidad StxA2 quimérica inactivada enzimáticamente y la subunidad StxB1 nativa. Como se utiliza en este caso, una "molécula de ácido nucleico recombinante" es una molécula de ácido nucleico que ha sido sometida a manipulación molecular *in situ*. Métodos para generar moléculas de ácido nucleico recombinantes son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, véase Sambrook *et al.* (2001) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. En las moléculas de ácido nucleico recombinante preferidas, una secuencia de nucleótidos de codificación está operativamente enlazada a secuencias de control de expresión y/o secuencias de vector.

[0035] La elección secuencias de control de vector y/o de expresión a las que una de las secuencias de codificación de la familia de la proteína de la presente invención está operativamente enlazada depende directamente, como se conoce

bien en la técnica, de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, expresión de proteína, y la célula huésped que se va a transformar. Un vector contemplado por la presente invención es al menos capaz de dirigir la replicación o la inserción en el cromosoma huésped, y preferiblemente, también la expresión, del gen estructural incluido en la molécula de ácido nucleico recombinante.

[0036] Elementos de control de expresión que se usan para el reglaje de la expresión de una secuencia codificante de proteína operativamente enlazada se conocen en la técnica e incluyen, pero de forma no limitativa, promotores inducibles, promotores constitutivos, señales de secreción y otros elementos reguladores. Preferiblemente, el promotor inducible es fácilmente controlado, tal como siendo sensible a un nutriente en el medio de la célula huésped.

[0037] En una forma de realización, el vector que contiene una molécula de ácido nucleico de codificación incluirá un replicón procariótico, es decir, una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir la replicación autónoma y mantenimiento de la molécula de ADN recombinante extracromosómicamente en una célula huésped procariótica, tal como una célula huésped bacteriana, transformada con la misma. Tales replicones son bien conocidos en la técnica. Además, los vectores que incluyen un replicón procariótico también pueden incluir un gen cuya expresión confiera una etiqueta detectable tal como una resistencia farmacológica. Genes de resistencia al fármaco bacteriano típicos son aquellos que confieren resistencia a la ampicilina o tetraciclina.

[0038] Vectores que incluyen un replicón procariótico pueden además incluir un promotor procariótico o bacteriófago capaz de dirigir la expresión (transcripción y traducción) de las secuencias génicas de codificación en una célula huésped bacteriana, tal como *E. coli*. Un promotor es un elemento de control de expresión formado por una secuencia de ADN que permite que se produzca la unión de ARN-polimerasa y la transcripción. Secuencias promotoras compatibles con huéspedes bacterianos están provistas típicamente en vectores plásmidos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN de la presente invención. Ejemplos típicos de tales plásmidos de vector son pBluescript II KS(-) (Stratagene), pTrcHis2C (Invitrogen), pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329 (BioRad), pPL y pKK223 (Pharmacia).

[0039] Vectores de expresión compatibles con células eucarióticas, preferiblemente aquellos compatibles con células vertebradas, también se pueden usar para formar moléculas de ácido nucleico recombinantes que contienen una secuencia codificante. Vectores de expresión de célula eucariota, incluyendo vectores víricos, se conocen bien en la técnica y están disponibles de diferentes fuentes comerciales. Típicamente, se proporcionan tales vectores conteniendo sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ADN deseado. Típicos de tales vectores son pSVL y pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnologies Inc.), pTDT1 (ATCC), el vector pCDM8 descrito aquí y vectores de expresión eucarióticos similares.

[0040] Vectores de expresión de célula eucariota usados para construir las moléculas de ácido nucleico recombinantes de la presente invención pueden incluir además una etiqueta seleccionable que sea eficaz en una célula eucariota, preferiblemente una etiqueta de selección de resistencia farmacológica. Una etiqueta de resistencia al fármaco preferida es el gen cuya expresión produce resistencia a la neomicina, es decir, el gen de neomicina fosfotransferasa (neo) (Southern *et al.* (1982) *J. Mol. Anal. Genet.* 1, 327-341). Alternativamente, el marcador seleccionable puede estar presente en un plásmido separado, y los dos vectores se introducen por co-transfección de la célula huésped y se seleccionan por cultivo en el medicamento apropiado para el marcador seleccionable. La presente invención proporciona además células huésped transformadas con una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención. La célula huésped puede ser procariótica o eucariótica.

[0041] Células eucarióticas útiles para la expresión de una proteína quimérica de la invención no están limitadas, mientras la línea celular sea compatible con métodos de cultivo celular y compatible con la propagación del vector de expresión y la expresión del producto génico. Células huésped eucarióticas adecuadas incluyen, pero de forma no limitativa, células de levadura, de insecto y mamíferas, preferiblemente células de vertebrados tales como las de la línea celular de ratón, rata, mono o humana. Células huésped eucarióticas ejemplares incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) disponible en el ATCC como CCL61, células de embrión de ratón suizo NIH (NIH-3T3) disponible en el ATCC como CRL 1658, células de riñón de cría de hámster (BHK) y líneas celulares de cultivo de tejido eucariota similares.

[0042] Cualquier huésped procariótico puede utilizarse para expresar una molécula de ácido nucleico recombinante que codifique una proteína quimérica de la invención. En una forma de realización, el huésped procariótico es *E. coli* tal como la cepa DH5 α o BL21. En formas de realización alternativas, el huésped procariótico es una cepa de vacuna bacteriana oral atenuada viva, tal como *Shigella flexneri* (Barry *et al.* (2003) *Vaccine* 21, 333-40) o *V. cholerae* (Leyten *et al.* (2005) *Vaccine* 23, 5120-5126).

[0043] Transformación de huéspedes celulares apropiados con una molécula de ADNr de la presente invención se realiza por métodos bien conocidos que típicamente dependen del tipo de vector usado y el sistema huésped empleado. Con respecto a la transformación de células huésped procarióticas, típicamente se emplean métodos de tratamiento de electroporación y sal, véase, por ejemplo, Cohen *et al.* (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110; y Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Con respecto a la transformación de células vertebradas con vectores que contiene ADNr, se emplean métodos de tratamiento de

electroporación, lípido catiónico o sal, véase, por ejemplo, Graham *et al.* (1973) *Viol.* 52,456; Wigler *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1373-1376.

[0044] Células transformadas con éxito, es decir, células que contienen una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención, se puede identificar por técnicas bien conocidas que incluyen la selección de una etiqueta seleccionable. Por ejemplo, células procedentes de la introducción de un ácido nucleico recombinante de la presente invención se pueden clonar para producir colonias únicas. Células de esas colonias se pueden cosechar, lisar y su contenido de ácido nucleico se puede examinar para la presencia del ácido nucleico recombinante utilizando un método tal como el descrito por Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503-504 o Berent *et al.* (1985) *Biotech.* 3, 208-209 o las proteínas producidas de la célula evaluada a través de un método inmunológico.

Producción de proteínas recombinantes

[0045] Un experto en la técnica sabría cómo hacer moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican toxoides de Shiga quiméricos de la invención. Además, un experto en la técnica sabría cómo usar estas moléculas de ácido nucleico recombinante para obtener las proteínas codificadas así, como se describe aquí para la molécula de ácido nucleico recombinante, que codifica un toxoide de Shiga híbrido.

[0046] Conforme a la invención, se pueden emplear numerosos sistemas de vector para la expresión del toxoide de Shiga híbrido. Por ejemplo, una clase de vectores utiliza elementos de ADN, que son derivados de virus de animal tales como virus del papiloma bovino, virus del polio, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MoMLV), virus de bosque Semliki o virus SV40. Adicionalmente, células, que tienen integrado de forma estable el ADN en sus cromosomas, se pueden seleccionar por introducción de uno o más marcadores, que permiten la selección de células huésped modificadas. El marcador puede proporcionar, por ejemplo, prototrofia para un huésped auxotrófico, resistencia biocida, (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre o similares. El gen marcador seleccionable puede estar bien directamente enlazado a las secuencias de ADN que se van a expresar o se puede introducir en la misma célula por cotransformación. Elementos adicionales también se pueden necesitar para síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir señales de empalme, al igual que promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación. Los vectores de expresión de ADNc que incorporan tales elementos incluyen aquellos descritos por Okayama (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3, 280-289.

[0047] El toxoide de Shiga híbrido se puede producir por (a) transfección de una célula con un vector de expresión que codifica el toxoide de Shiga híbrido; (b) cultivo de la célula transfectada resultante bajo condiciones tales que el toxoide de Shiga híbrido se produzca; y (c) recuperación del toxoide de Shiga híbrido de los medios de cultivo celulares o las células en sí.

[0048] Una vez que el vector de expresión o secuencia de ADN que contiene los constructos se ha preparado para la expresión, los vectores de expresión se puede transfectar o introducir en un huésped celular eucariótico o procariótico apropiado. Diferentes técnicas se pueden emplear para conseguir esto, tal como, por ejemplo, fusión de protoplasto, precipitación de fosfato cálcico, electroporación u otras técnicas convencionales. En el caso de la fusión de protoplasto, las células se cultivan en medios y se seleccionan para la actividad apropiada.

[0049] Métodos y condiciones para cultivar las células transfectadas resultantes y para recuperar el toxoide de Shiga híbrido así producido son conocidos por los expertos en la técnica, y se puede variar u optimizar dependiendo del vector de expresión específico y célula huésped empleada.

[0050] La célula huésped para la expresión del toxoide de Shiga híbrido puede ser procariótica o eucariótica. Huéspedes procarióticos ejemplares incluyen *E. coli*, tal como *E. coli* DH5 α o BL21. Huéspedes eucarióticos ejemplares incluyen sistemas de expresión de célula de insecto/vector de baculovirus, sistemas de expresión de célula de levadura/vector transportador. Métodos y condiciones para la purificación del toxoide de Shiga híbrido a partir de los medios de cultivo se proporcionan en la invención, pero se debe reconocer que estos procedimientos se pueden variar u optimizar como ya conocen aquellos expertos en la técnica.

[0051] Las proteínas de toxoide de Shiga híbridas de la presente invención también se pueden preparar por cualquier técnica sintética conocida. Convenientemente, las proteínas se pueden preparar utilizando la técnica sintética de fase sólida inicialmente descrita por Merrifield (1965). Otras técnicas de síntesis de péptido se pueden encontrar, por ejemplo, en Bodanszky *et al.* (1976), *Peptide Synthesis*, Wiley.

Composiciones inmunogénicas y usos de las mismas

[0052] El toxoide de Shiga híbrido quimérico de la invención se puede utilizar en una vacuna, composición inmunogénica o farmacéutica para generar una respuesta inmune contra una Stx. El toxoide de Shiga quimérico también puede usarse en combinación con otras composiciones menos inmunogénicas para ayudar a suscitar una respuesta inmune contra las composiciones inmunogénicas. Generalmente, cuando se usa en combinación con otra composición inmunogénica, la composición inmunogénica en sí no es suficiente para suscitar una respuesta inmune y proporcionar un efecto de protección contra un patógeno. En una forma de realización, los toxoides de Shiga de la

invención se usan en combinación con la toxina diftérica como un medio para suministrar un efecto de protección contra la infección por *Corynebacterium diphtheriae*.

[0053] En una forma de realización, el toxoide de Shiga híbrido se usa con un adyuvante adecuado, como se entiende generalmente en la técnica. Actualmente, adyuvantes aprobados para su uso humano en Estados Unidos incluyen, por ejemplo, sales de aluminio (alumbre). Estos adyuvantes han sido útiles para algunas vacunas incluyendo hepatitis B, difteria, polio, rabia y gripe. Otros adyuvantes útiles incluyen adyuvante de Freund completo (CFA), dipéptido de muramil (MDP), análogos sintéticos de MDP, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-[1,2-dipalmitoil-s-glicero-3-(hidroxifosforiloxi)]etilamida (MTP-PE), adyuvante de Freund incompleto (IFA) y composiciones que contiene un aceite degradable y un agente emulsionante, donde el aceite y agente emulsionante están presentes en forma de una emulsión de aceite en agua que tiene gotitas de aceite sustancialmente todas ellas son menores de una micra de diámetro.

[0054] La formulación de una vacuna, composiciones farmacéuticas o inmunogénicas emplearán una cantidad eficaz del toxoide de Shiga quimérico. Es decir, se incluirá una cantidad de antígeno que, en combinación con el adyuvante, hará que el sujeto produzca una respuesta inmunológica específica y suficiente para impartir protección al sujeto de exposición posterior a Stx. Cuando se usa como una composición inmunogénica, la formulación contendrá una cantidad de antígeno, que, en combinación con el adyuvante, hará que el sujeto produzca anticuerpos específicos, que se puede usar para fines de diagnóstico o terapéuticos.

[0055] Las composiciones de vacuna, farmacéuticas o inmunogénicas pueden ser útiles para la prevención o terapia del síndrome urémico hemolítico (HUS) y/o para el tratamiento de la diarrea. En una forma de realización, la vacuna y/o composición inmunogénica se usa para la prevención del HUS en personas mayores y niños. En otra forma de realización, la vacuna y/o composición inmunogénica se usa para la prevención del HUS u otras consecuencias de la infección de STEC o intoxicación de Stx provocadas por actos de terrorismo, especialmente para la administración a personal militar. Frecuentemente, es necesaria más de una administración para provocar el efecto terapéutico o profiláctico deseado; el protocolo exacto (dosificación y frecuencia) se puede establecer por procedimientos clínicos estándar.

[0056] El toxoide de Shiga híbrido o composiciones farmacéuticas que comprenden el toxoide de Shiga híbrido de la presente invención se pueden administrar a través de vías parenterales, subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraperitoneales, transdérmicas o bucales. Alternativamente, o al mismo tiempo, la administración puede ser por la vía oral. En una forma de realización especialmente adecuada para niños, una composición farmacéutica que comprende el toxoide de Shiga se administra por vía oral. La dosificación administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, frecuencia de tratamiento y naturaleza del efecto deseado.

[0057] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede contener soportes farmacéuticamente aceptables adecuados que comprendan excipientes y productos auxiliares que faciliten el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones, que se pueden usar farmacéuticamente para la administración en el sitio de acción. Formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble, por ejemplo, sales hidrosolubles. Además, suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección oleaginosas apropiadas se pueden administrar. Solventes lipofílicos adecuados o vehículos que incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintético, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Suspensiones de inyección acuosas puede contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores.

[0058] Las cantidades precisas y formulaciones para su uso en la prevención o la terapia pueden variar dependiendo de las circunstancias de la pureza inherente y la actividad del antígeno, cualquier ingrediente adicional o portador, el método de administración y similares.

[0059] La fórmula farmacéutica para la administración sistémica según la invención se puede formular para administración enteral, parenteral o tópica. De hecho, los tres tipos de formulaciones se pueden utilizar simultáneamente para conseguir la administración sistémica de la sustancia activa.

[0060] Se puede utilizar la administración tópica. Cualquier formulación tópica común tal como una solución, suspensión, gel, pomada o ungüento y similar se puede emplear. La preparación de tales formulaciones tópicas se describen en la técnica de formulaciones farmacéuticas como se ejemplifica, por ejemplo, en Gennaro *et al.* (2000) Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing. Para la aplicación tópica, las composiciones se podrían también administrar como un polvo o spray, particularmente en forma de aerosol.

[0061] Formulaciones adecuadas para administración oral incluyen cápsulas blandas o duras de gelatina, píldoras, comprimidos, incluyendo comprimidos recubiertos, elixires, suspensiones, jarabes o inhalaciones y formas de liberación controlada de los mismos.

[0062] Mediante ilustración no limitativa, las dosificaciones de vacuna administradas serán típicamente, con respecto al antígeno, un mínimo de aproximadamente 0,1 mg/dosis, más típicamente un mínimo de aproximadamente 1 mg/dosis y frecuentemente un mínimo de aproximadamente 10 mg/dosis. Las dosificaciones máximas típicamente no son tan críticas. Normalmente, no obstante, la dosificación será no más de 500 mg/dosis, frecuentemente no más de 250 mg/dosis. Estas dosificaciones se pueden suspender en cualquier vehículo o portador farmacéutico apropiado en el volumen suficiente para portar la dosificación. Generalmente, el volumen final, incluyendo portadores, adyuvantes y similares, típicamente será al menos 0,1 ml, más típicamente al menos aproximadamente 0,2 ml. El límite superior está determinado por la practicidad de la cantidad que se va a administrar, generalmente no más de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,0 ml.

[0063] En un formato alternativo, composiciones de vacuna, farmacéuticas o inmunogénicas se pueden preparar como vectores de vacuna, que expresan el toxoide de Shiga híbrido quimérico o fragmento del mismo en el animal huésped. Se puede utilizar cualquier vector de vacuna disponible, incluyendo virus de encefalitis equina venezolana vivo (véase la patente de EE.UU. 5.643.576), poliovirus (véase la patente de EE.UU. 5.639.649), virus de sífilis (véase la patente de EE.UU. 5.770.211) y virus de vaccina (véase las patentes de EE.UU. 4.603.112 y 5.762.938). Alternativamente, el ácido nucleico desnudo que codifica la proteína o el fragmento de la misma se puede administrar directamente para efectuar la expresión del antígeno (véase la patente de EE.UU. 5.739.118).

[0064] En una forma de realización de la invención, un nucleótido que codifica el toxoide de Shiga híbrido se transforma en una cepa de vacuna bacteriana oral atenuada viva tal como por ejemplo *Shigella flexneri* (Barry *et al.* (2003) Vaccine 21, 333-40) o *V. cholerae* (Leyten *et al.* (2005) Vaccine 23, 5120-5126). Así, tales cepas de vacuna bacteriana oral habrían expandido cobertura de protección expandida para incluir la Stx.

[0065] En otra forma de realización de la invención, un nucleótido que codifica el toxoide de Shiga híbrido se transforma en una planta para crear una vacuna a base de planta comestible. Alternativamente, un nucleótido que codifica el toxoide de Shiga híbrido podría ser administrado como una vacuna a base de ADN. Ácidos nucleicos que codifican los toxoides quiméricos se administran como vacunas de ADN, bien como únicos genes o como combinaciones de genes. Vacunas de ADN desnudas se conocen generalmente en la técnica (véase Brower (1998), Nature Biotechnology, 16:1304-1305). Métodos para el uso de genes como vacunas de ADN son bien conocidos para un técnico en la materia, e incluyen colocación de un gen de toxoide quimérico o parte del mismo bajo el control de un promotor para la expresión en un sujeto con necesidad de tratamiento. El gen usado para vacunas de ADN puede codificar proteínas de toxoide quiméricas en toda su longitud, pero también puede codificar partes de las proteínas toxoides incluyendo péptidos derivados de cualquier gen de toxina de Shiga. La vacuna de ADN puede contener genes de subunidad A y B para la expresión como operones individuales bajo la dirección de promotores individuales y/o distintos e incluir la reorganización de la orden de las dos regiones de codificación. Las modificaciones hechas a las secuencias de nucleótidos tales como la incorporación de 5' y 3' regiones no traducidas de origen vírico o eucariota, señales de poliadenilación, optimización de codón para la expresión óptima en un sistema eucariota están también abarcadas por la invención. En una forma de realización, un sujeto es inmunizado con una vacuna de ADN que comprende una pluralidad de secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de toxoide quimérica. De forma similar, es posible inmunizar un sujeto con una pluralidad de genes de toxoide o partes de los mismos tal y como se define aquí.

[0066] En otra forma de realización, las vacunas de ADN incluyen un gen que codifica una molécula adyuvante con la vacuna de ADN. Tales moléculas adyuvantes incluyen citocinas que aumentan el respuesta inmunogénica a la proteína toxoide codificada por la vacuna de ADN. Adyuvantes adicionales o alternativos son conocidos por los técnicos en la materia y encuentran su uso en la invención. Alternativamente, el gen de toxoide quimérico en sí puede servir como un adyuvante en una vacuna de ADN que contiene un ácido nucleico que codifica otro inmunógeno diferente.

[0067] El toxoide de Shiga híbrido se puede utilizar en combinación, por ejemplo, simultáneamente, con vacunas para otras enfermedades. Así, el toxoide de Shiga híbrido puede formar parte de una composición para el tratamiento y la prevención de la disentería y la diarrea, incluyendo diarrea del viajero. Tal composición sería particularmente útil para los niños de países del tercer mundo que están expuestos a Stx y/o bacterias que expresan Stx. Los efectos de Stx en los niños tienden a ser severos, llevando en algunos casos al daño renal permanente. La prevención de infección y la posterior exposición a Stx en niños es por lo tanto un uso preferido para las proteínas de toxoide de Shiga quiméricas de la invención.

Anticuerpos y métodos de uso

[0068] Esta divulgación proporciona además un anticuerpo policlonal dirigido por lo menos a un epítipo de la subunidad StxA2 y al menos un epítipo de la subunidad StxB1 y que es capaz de prevenir, tratar o diagnosticar el síndrome urémico hemolítico.

[0069] Los anticuerpos de la divulgación se pueden marcar con una etiqueta detectable. Marcadores detectables útiles en la práctica de esta divulgación son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden ser, pero de forma no limitativa, radioisótopos, colorantes o enzimas tales como peroxidasa o fosfatasa alcalina y nanopartículas. Anticuerpos marcados con marcadores detectables son particularmente útiles para el diagnóstico. El equipo puede contener además anticuerpos anti-StxA2 y anti-StxB1 monoclonales o policlonales que están marcados con una etiqueta detectable y

otros sustituyentes bien conocidos en la técnica. Tal equipo es particularmente útil para la detección de bacterias productoras de Stx o Stx tales como *S. dysenteriae* y *E. coli in vivo e in vitro* y para el diagnóstico de HUS.

5 [0070] Esta divulgación también concierne a un anticuerpo anti-idiotípico dirigido contra los anticuerpos policlonales humanos. Este anticuerpo anti-idiotípico también se puede marcar con una etiqueta detectable. Marcadores detectables adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia de la técnica y pueden ser, pero de forma no limitativa, radioisótopos, colorantes o enzimas, tales como peroxidasa o fosfatasa alcalina.

10 [0071] El anticuerpo anti-idiotípico se produce cuando a un animal se le inyecta un anticuerpo policlonal, que se enlaza a un epítipo de la subunidad StxA2 y al menos un epítipo de la subunidad StxB1. El animal quieries producirá entonces anticuerpos dirigidos contra los determinantes idiotípicos del anticuerpo inyectado (Wasserman *et al.* (1982), Proc. Nati. Acad. Sci. 79, 4810-4814).

15 [0072] Alternativamente, el anticuerpo anti-idiotípico se produce por: (1) puesta en contacto de células linfoides de un animal con una cantidad aumentadora de anticuerpo eficaz del antígeno (es decir, el anticuerpo policlonal que se enlaza en un epítipo de la subunidad StxA2 y al menos en un epítipo de subunidad StxB1); (2) recolección de las células linfoides resultantes; fusión de las células linfoides recogidas con células de mieloma para producir una serie de células de hibridoma, cada una de las cuales produce un anticuerpo monoclonal; (3) selección de las series de células de hibridoma para identificar aquellas que segregan un anticuerpo monoclonal capaz de unión de la célula de hibridoma resultante así identificada; y (4) separadamente recuperación del anticuerpo anti-idiotípico producido por esta célula (Cleveland *et al.* (1983) Nature 305, 56-57). Animales, que se pueden usar para la producción de anticuerpos anti-idiotípicos en cualquiera de los dos métodos anteriormente identificados, incluyen, pero de forma no limitativa, seres humanos, primates, ratones, ratas o conejos.

25 Ensayos de diagnóstico

[0073] El toxoide de Shiga híbrido de la presente invención se puede utilizar como reactivos de diagnóstico en inmunoensayos para detectar anticuerpos anti-Stx, particularmente anticuerpos anti-StxA2 y anticuerpos anti-StxB1. Los protocolos de inmunoensayo pueden estar basados, por ejemplo, en ensayos de composición, reacción directa o tipo sándwich. Los protocolos pueden ser también, por ejemplo, heterogéneos y usar soportes sólidos, o puede ser homogéneos y constar de reacciones inmunológicas en la solución. La mayoría de los ensayos incluyeron el uso de anticuerpo o polipéptido marcado. Las etiquetas pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, nanopartículas o de tinte. Ensayos que amplifican las señales a partir de la sonda también se conocen, ejemplos de tales ensayos son los que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos marcados y mediados con enzima, tales como ensayos de ELISA.

40 [0074] Típicamente, un inmunoensayo para anticuerpos anti-Stx implicará la selección y la preparación de la muestra de prueba, tal como una muestra biológica, y luego la incubación de ésta con un toxoide de Shiga híbrido modificado de la presente invención bajo condiciones que permitan la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Tales condiciones se conocen en la técnica. En un formato heterogéneo, la proteína o péptido está ligado a un soporte sólido para facilitar la separación de la muestra del polipéptido tras la incubación. Ejemplos de soportes sólidos que se pueden usar son nitrocelulosa, en forma de membrana o de pocillo de microtitulación, cloruro de polivinilo, en láminas o pocillos de microtitulación, látex de poliestireno, en microesferas o placas de microtitulación, fluoruro de polivinilidina, papel diazotizado, membranas de nilón, microesferas activadas y microesferas de proteína A. De la forma más preferida, se usan placas de microtitulación Immulon® de Dynatech o microesferas de poliestireno de 0,25 pulgadas en el formato heterogéneo. El soporte sólido se lava típicamente después de separarlo de la muestra de prueba.

50 [0075] En el formato homogéneo, por otro lado, la muestra de prueba se incuba con el toxoide de Shiga híbrido en la solución, bajo condiciones que precipitarán cualquier complejo antígeno-anticuerpo que se forme, como se conoce en la técnica. Los complejos precipitados se separan luego de la muestra de prueba, por ejemplo, por centrifugado. Los complejos formados que comprenden anticuerpos anti-Stx se detectan por cualquier número de técnicas. Dependiendo del formato, los complejos se pueden detectar con inmunoglobulina anti-xenogénica marcada o, si se usa un formato competitivo, por medición de la cantidad de anticuerpo de competencia ligado, marcado. Estos y otros formatos se conocen bien en la técnica.

55 [0076] Sondas de diagnóstico útiles en tales ensayos incluyen anticuerpos para Stx. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales producidos usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica (véase Harlow & Lane (1988), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se pueden usar para detectar Stx por unión específica a la proteína y posterior detección del complejo anticuerpo-proteína por ELISA, Western blot o similar. El toxoide de Shiga híbrido usado para suscitar estos anticuerpos puede ser cualquiera de las variantes mencionadas anteriormente. Anticuerpos también se producen a partir de secuencias peptídicas del toxoide de Shiga híbrido utilizando técnicas estándar en la técnica (Harlow & Lane, *supra*). Fragmentos de antiseros monoclonales o policlonales, que contienen la parte inmunológicamente significativa, también se pueden preparar.

[0077] Los siguientes ejemplos prácticos apuntan específicamente a formas de realización preferidas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera del resto de la divulgación. Otras configuraciones genéricas serán evidentes para un experto en la materia.

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1: construcción de *stxA2* /*stxB1* quimérica y mutaciones toxoides

10 [0078] Se construyó una versión convertida genéticamente en toxoide de Stx que se pudo usar como vacuna para proteger contra Stx1 y Stx2. Debido a que la proteína StxB1 es altamente inmunogénica y más protectora que la proteína de la subunidad StxB2 (Marcató *et al.* (2001) *J. Infect. Dis.* 183, 435-43), StxB1 se usó para la parte de subunidad B de la vacuna. StxA2 se eligió para la subunidad A del constructo de vacuna.

15 [0079] Los genes *stxA2* y *stxB1* fueron empalmados juntos para generar una fusión de operón compuesta por *stxA2* seguida de la región intergénica de *stxB1* nativo que contiene el sitio de unión ribosómico para la traducción de StxB1, luego del gen *stxB1*. El casete de expresión holotoxoide fue diseñado en la configuración del operón nativo para optimizar la traducción y el ensamblaje del holotoxoide AB5.

20 [0080] Después, la parte StxA2 del toxoide quimérico fue modificada por introducción de tres modificaciones (Y77S, E167Q y R170L) para prevenir un potencial de reversión a la toxicidad y para maximizar la inmunogenicidad. La selección de estas mutaciones se basó en estudios previos que mostraron que estas mutaciones bien reducían la citotoxicidad de la toxina o aumentaban la inmunogenicidad de un toxoide. La sustitución de tirosina en la posición 77 a serina fue generada porque este cambio reduce sustancialmente la actividad de Stx1, y nosotros predijimos que lo mismo ocurriría para Stx2 (Deresiewicz *et al.* (1992) *Biochemistry* 31, 3272-80; Deresiewicz *et al.* (1993) *Mol. Gen. Gent.* 241, 467-73). La decisión de cambiar el ácido glutámico en la posición 167 de StxA2 a glutamina se tomó porque este aminoácido está en el sitio activo de ambos Stx1 y Stx2 y tal alteración lleva a una reducción espectacular en la actividad de las células Vero de la toxina (Gordon *et al.* (1992) *Infect. Immun.* 65, 2509- 16; Hovde *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 2568-72; Jackson *et al.* (1990) *J Bacteriol* 182, 3346-50; Yamaski *et al.* (1991) *Mircob. Pathog.* 11, 1-9). La elección de reemplazar arginina en la posición 170 con leucina refleja la observación de Ishikawa *et al.* de que la proteína StxA1 es más inmunogénica después de tal sustitución (Ishikawa *et al.* (2003) *Infect Immun* 71, 3235-9). A continuación se muestra una descripción detallada de la metodología.

35 [0081] Los plásmidos bacterianos usados aparecen en la tabla 1. Las bacterias se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) o en agar de LB (Becton Dickinson) suplementados con 100 µg/ml de ampicilina según fue necesario para selección de plásmidos recombinantes.

Tabla 1: Plásmidos de clonación y expresión

| | |
|-------------------|---|
| pBluescript SK II | Vector de clonación de <i>E. coli</i> (Amp ^r) |
| pTrcHis2 C | Vector de expresión de <i>E. coli</i> (Amp ^r) |
| pCKS112 | clon <i>stx1</i> |
| pJES120 | clon <i>stx2</i> |
| pMJS1 | pBluescript II KS (-) clon de <i>stx1</i> a partir de pCKS 112 |
| pMJS2 | pBluescript II KS (-) clon de <i>stx2</i> a partir de pJES120 |
| pMJS21 | pBluescript II KS (-) clon de <i>stxA2</i> / <i>stxB1</i> |
| pMJS22 | pMJS21 con mutación StxA2 Y77S |
| pMJS23 | pMJS22 con mutaciones StxA2 E167Q y R170L |
| pMJS24 | clon toxoide <i>stxA2</i> / <i>stxB1</i> a partir de pMJS23 clonado en pTrcHis2 C |
| pMJS25 | vector de clonación-TA pCR2.1 clon de pMJS23 con StxA2 E167Q cambio de CAA (Q) a CAG (Q) |
| pMJS26 | clon pTrcHis2 C del clon toxoide <i>stxA2</i> / <i>stxB1</i> hecho en pMJS25 con seis histidinas añadidas al C-terminal de StxB1. |
| pMJS27 | clon pTrcHis2 C del clon toxoide <i>stxA2</i> / <i>StxB1</i> hecho en pMJS26 con mutaciones D16H y D17H de StxB1 |

40 [0082] El operón *stxA2*/*stxB1* quimérico fue creado por una serie de reacciones en cadena de polimerasa (PCR) seguida de un paso de empalme por extensión de superposición (SOE) (Higuchi *et al.* (1989), PCR Technology, Stockton Press). Específicamente, la amplificación por PCR de secuencias a partir de pMJS2 con cebadores MJS5 y MJS32 (véase tabla 2) se usó para sintetizar *stxA2*; de forma similar, la amplificación por PCR de secuencias a partir de pMJS1 con los cebadores MJS20 y MJS2 se usó para generar *stxB1*. Después de que los productos de PCR *stxA2* y *stxB1* fueran

empalmados juntos, el operón *stxA₂/stxB₁* quimérico fue clonado en pBluescript II KS- à (Stratagene) bajo la dirección del promotor *stx₂*. El plásmido resultante fue denominado pMJS21 y transformado en *E. coli* DH5α.

| Tabla 2: cebadores oligonucleótidos sintéticos (5' a 3') | | |
|--|--|--|
| Cebador | Secuencia de cebador (5' a 3') | Propósito/Región de homología |
| MJS1 | gatcggatcccctgtaacgaagttgcgtaacagc (SEC ID n°: 4) | <i>stx₁</i> cebador arriba |
| MJS2 | gatcgaattctcgcttacgatcatcaaagagatcatacc (SEC ID n°: 5) | <i>stx₁</i> cebador abajo |
| MJS5 | gatcggatccagcaaggccacatatacacataccgcc (SEC ID n°: 6) | <i>stx₂</i> cebador arriba |
| MJS6 | caggggaattcaccatgcgaaatTTTTTaaacaatgc (SEC ID n°: 7) | <i>stx₂</i> cebador abajo |
| MJS20 | gggggtaaatagaaaaaacattattaatagc (SEC ID n°: 8) | Usado con MJS32 para generar pMJS21 |
| MJS32 | gctattaataatgttttttcatTTTacccttatttaccggtgtatataaaaactg (SEC ID n°: 9) | Usado con MJS20 para generar pMJS21 |
| MJS88 | tcagtggccgggttcgtaatacgg (SEC ID n°: 10) | Usado con MJS89 para generar pMJS22 |
| MJS89 | ccgtattaacgaaccggcactgataaatttttgcataaatcagacgaagatggc (SEC ID n°: 11) | Usado con MJS88 para generar pMJS22 |
| pMJS90 | caagcctattattcaggcagatacagagagaatttcgctcaggc (SEC ID n°: 12) | Usado con MJS91 para generar pMJS23 |
| MJS91 | ctctgtatctgcctgaataataaggcttgctgtgacagtgacaaaacgcagaactgctctgg (SEC ID n°: 13) | Usado con MJS90 para generar pMJS23 |
| 2A5SD | gatcggatcctaaggaggacagctatgaagtgtatattttaaattgggtactg (SEC ID n°: 14) | Usado para generar pMJS24, pMJS26, and pMJS27 |
| MJS97 | gatcatcgatagccaaaaggaacacctgtatg (SEC ID n°: 15) | <i>stxA₂</i> cebador arriba, usado para generar pMJS25 |
| MJS98F | gatcgcctagctcaacgaaaataacttcgctgaatcc (SEC ID n°: 16) | <i>stxB₁</i> cebador abajo usado para generar pMJS25 |
| MJS92 | caggcctattattcaggcag (SEC ID n°: 17) | Usado con MJS93 para generar pMJS25 |
| MJS93 | ctgcctgaataataaggcctgtgctgtgacagtgacaaaacgcagaactgctctggatgc (SEC ID n°: 18) | Usado con MJS92 para generar pMJS25 |
| 1BC1 | gggtggtggtgacgaaaataacttcgctgaatcc (SEC ID n°: 19) | <i>stxB₁</i> marcado con His cebador abajo #1, usado para generar pMJS26 y pMJS27 |
| 1BC2 | cagtgggtggtggtggtgacgaaaataac (SEC ID n°: 20) | <i>stxB₁</i> marcado con His cebador abajo #2, usado para generar pMJS26 y pMJS27 |
| 1BC3 | gatcgaattctcagtgggtggtggtggtg (SEC ID NO: 21) | <i>stxB₁</i> marcado con His cebador abajo #3, usado para generar pMJS26 y pMJS27 |
| 1B2HF | catcacgataccttacagtaaagtggg (SEC ID NO: 22) | Usado con 1B2HR para generar pMJS27 |
| 1B2HR | tttaactgtaaaggatcgatgatgattatatttgtatactccacc (SEC ID NO: 23) | Usado con 1B2HF para generar pMJS27 |
| Los sitios de enzima de restricción están subrayados, sitios de codón mutagénico están en audaz. | | |

5

10

15

[0083] Después, un conjunto de cambios de nucleótidos se llevaron a cabo por ingeniería en el gen *stxA₂* de *stxA₂/stxB₁* para generar un operón a partir del cual se pudiera expresar una molécula de toxoide híbrido. Específicamente, la tirosina de la posición 77 de la proteína madura StxA2 se cambió a un residuo de serina por amplificación del ADN con los cebadores mutagénicos MJS88 y MJS89 y los cebadores flanqueantes MJS2 y MJS5 para producir pMJS22. Luego el ácido glutámico en el sitio activo de StxA2 (residuo 167) fue alterado a una glutamina y la arginina de la posición 170 fue cambiada a una lisina simultáneamente por PCR con cebadores mutagénicos MJS90 y MJS91 y cebadores flanqueantes MJS2 y MJS5 para producir pMJS23. El operón de toxoide quimérico fue luego amplificado a partir de pMJS23 por PCR con los cebadores 2A5SD y MJS2 para introducir una secuencia optimizada de Shine-Dalgarno (TAAGGAGGACAGCTATG) (SEC ID n°: 24) arriba del codón de inicio para StxA2 y para eliminar el promotor nativo *stx₂*. El clon quimérico resultante fue ligado en el vector de expresión pTrcHis2 C (Invitrogen) y transformado en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). El análisis de secuencia de ADN fue realizado por el Biomedical Instrumentation Center de la Uniformed Services University para verificar que se hacían las mutaciones correctas.

Ejemplo 2: purificación del toxoide StxA2/StxB1

[0084] La purificación del toxoide StxA2/StxB1 fue hecha por purificación de afinidad de Gb3 como se ha descrito previamente (Ishikawa *et al.* (2003) *Infect. Immun.* 71, 3235-9; Wen *et al. supra*). La purificación de afinidad de Gb3 es un proceso que captura el dominio de unión de la subunidad B. Un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) durante toda la noche que contenía el clon pTrcHis2 C-stxA₂/stxB₁ fue diluido 1:50 en dos matraces, cada uno conteniendo 500 ml de caldo LB. Después de 2 horas de crecimiento, los cultivos fueron inducidos con 1 mM de isopropilo 3-D-tiogalactopiranosida (EPTG) e incubados durante 4 horas más.

[0085] Las bacterias se granularon por centrifugado y se concentraron 50 veces por resuspensión en 10 ml de 1? de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (PBS). Las suspensiones bacterianas concentradas fueron luego interrumpidas por sonicación y los lisados resultantes clarificados por centrifugado. El toxoide StxA2/StxB1 fue purificado a partir de estos lisados por purificación de afinidad de Gb3 en columnas de Globotriose Fractogel (IsoSep AB) como se ha descrito previamente (Ishikawa *et al., supra*; Wen *et al., supra*). Después de la purificación del toxoide, se hizo un ensayo BCA (Pierce) para cuantificar la concentración de la proteína de la preparación.

Ejemplo 3: ensayo de citotoxicidad

[0086] La actividad citotóxica para las células Vero de varias muestras fue evaluada tal y como se ha descrito anteriormente. En resumen, *E. coli* DH5 α transformado con clones de toxina en PBluescript II KS (-) fueron normalizados a la misma densidad óptica (O.D.)₆₀₀, y las bacterias fueron interrumpidas por sonicación y clarificadas por centrifugado. Los lisados sónicos clarificados o el toxoide purificado se evaluaron para actividad citotóxica de célula Vero (Schmitt *et al.* (1991) *Infect. Immun.* 59, 1065-73; Gentry *et al.* (1980) 26, 2127-31) después de diluir las muestras en medio esencial mínimo Eagle (Cambrex BioScience) suplementado con 9% de suero bovino fetal (BioSource International), 1,8 mM de glutamina (Cambrex), 9 U/ml de penicilina, 9 μ g/ml de estreptomycin (Invitrogen Corporation) y 90 μ g/ml de gentamicina (Quality Biological) (EMEM completo). El 50% de la dosis citotóxica (CD₅₀) de las muestras fue definida como el recíproco de la dilución que mató el 50% de las células Vero, en comparación con las células de control no tratadas.

[0087] Las actividades citotóxicas de las versiones diferentes de los toxoides StxA2/StxB1 mutado para células Vero fueron comparadas con la toxina StxA2/StxB1 progenitora (véase tabla 3). Mientras un ml de un lisado sónico clarificado de la toxina híbrida progenitora contenía $7,2 \times 10^4$ CD₅₀s, los lisados preparados de forma similar de la molécula quimérica alterada con una única mutación (Y77S) o las mutaciones triples (Y77S, E167Q y R170L) no tuvieron ninguna actividad citotóxica demostrable, un hallazgo que confirmó que estos constructos producían toxoides. Adicionalmente, 2,1 μ g del toxoide StxA2/StxB1 purificado no fue citotóxico para las células Vero; fue aproximadamente 97 veces la concentración de la toxina progenitora StxA2/StxB1 evaluada. La cantidad de la toxina StxA2/StxB1 progenitora fue determinada por análisis de Western blot utilizando anticuerpo policlonal contra Stx2 y cuantificación de la subunidad StA2 por comparación con un Stx2 estándar. Para determinar si hubo cualquier actividad residual a niveles muy bajos del toxoide StxA2/StxB1, una preparación de 100 veces de lisado bacteriano crudo se evaluó para citotoxicidad en células Vero y para toxicidad en ratones. Cinco ratones machos CD-1 fueron inyectados intraperitonealmente 86 μ g del toxoide (este corresponde a 20 veces la cantidad usada para inmunizar y estimular a los ratones) y todos los ratones sobrevivieron. Adicionalmente, 61,3 μ g del toxoide de la preparación de 100 veces de lisado bacteriano crudo fue evaluado para citotoxicidad y resultó ser no citotóxica para las células Vero.

| Toxina o toxoide | Citotoxicidad (célula Vero CD ₅₀ /ml de cultivo) |
|---|---|
| pBluescript II (KS-) | $<1 \times 10^2$ |
| Stx1 | 8.1×10^6 |
| Stx2 | 5.5×10^4 |
| SbcA2/StxB1 | 7.2×10^4 |
| StxA2/StxB1 (Y77S) | $<1 \times 10^2$ |
| StxA2/StxB1 (Y77S, E167Q, R170L) | $<1 \times 10^2$ |
| StxA2/StxB1 toxoide (purificado, 2,1 μ g) | $<1 \times 10^2$ |

[0088] Lisados de toxina se transformaron a partir de *E. coli* DH5 α con pMJS1 (Stx1), pMJS2 (Stx2), pMJS21 (StxA2/StxB1), pMJS22 (StxA2/StxB1 con StxA2 Y77S), pMJS23 (StxA2/StxB1 con StxA2 Y77S, E167Q y R170L). El toxoide StxA2/StxB1 purificado fue purificado a partir de *E. coli* B121. Los valores representan el recíproco de la dilución que mató el 50% de las células Vero. El límite de detección para este experimento fue 1×10^2 .

Ejemplo 4: análisis de Western blot

[0089] Los toxoides purificados Stx1, Stx2 o StxA2/StxB1 (300 ng cada uno) fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE; 15% de poliacrilamida) y luego las proteínas fueron transferidas a 0,45 µM de membranas de nitrocelulosa Optitran (Schleicher & Schuell) con un equipo de transferencia Trans-Blot SD Semi-Dry (Bio-Rad) (véase la figura 1). Las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche a 4°C en una solución de 5% de leche en polvo sin grasa en 1 × de solución salina Tris-tamponada (pH 7,5) con 0,1% de Tween 20 añadido (TBST). Los anticuerpos primarios, sobrenadantes de cultivo de tejido de hibridoma diluidos 1:5 cada uno en solución de bloqueo de anticuerpos monoclonales anti-StxA2 y anti-StxB1 (MAbs) 11E10 y 13C4, respectivamente (Gentry *et al.* (1980) *J. Clin. Microbiol.* 12, 361-6; Perera *et al.* (1980) *J. Clin. Microbiol.* 26, 2127-31), fueron incubados con las inmunotransferencias durante dos horas. Las membranas fueron luego lavadas en TBST e incubadas durante una hora con inmunoglobina anti-ratón cabra G(IgG) conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Bio-Rad) en una dilución de 1:3.000 en la solución de bloqueo. Las membranas fueron lavadas nuevamente como se ha descrito anteriormente, y el anticuerpo secundario fue detectado por quimioluminiscencia con el equipo de detección de transferencia de Western ECL-Plus (Amersham).

[0090] La inmunotransferencia del toxoide purificado reveló que ambos StxB1 y StxA2 estaban presente (véase la figura 1), un hallazgo que confirmó nuestra suposición de que un holotoxide fue expresado por el constructo de vacuna. Además, las bandas inmunoreactivas del toxoide correspondían en tamaño a los controles de la subunidad de toxina nativa (véase la figura 1). Las subunidades StxA2 y StxB1 fueron también visible en el gel manchado de plata con pequeña evidencia de proteínas contaminantes adicionales (datos no mostrados).

Ejemplo 5: inmunización de ratón e inoculación

[0091] Sueros preinmunes fueron recogidos de ratones CD-1 macho que pesaban de 14 a 16 gramos (Charles River). Los ratones fueron luego inmunizados intraperitonealmente (i.p.) con bien PBS o 4,3 µg de toxoide StxA2/StxB1 purificado en PBS mezclado 1:1 con TiterMax Gold, un adyuvante de agua en aceite (TiterMax USA) (volumen total 100 µl). Los ratones fueron estimulados en intervalos de tres semanas, durante un total de tres estímulos. Se recogió suero diez días después de la inmunización inicial y después de cada estímulo para determinar los niveles de inmunoglobina en suero G(IgG) contra Stx1 o Stx2. Los ratones fueron inoculados i.p. 14 días después del tercer estímulo con 10 veces el 50% de la dosis letal (LD₅₀) de Stx1 (1.250 ng) o Stx2 (10 ng) o ambos Stx1 y Stx2 (1.250 y 10 ng/ratón, respectivamente).

[0092] Todos los ratones inmunizados con PBS 4 estaban muertos al 4º día, independientemente del tipo de Stx administrado (véase tabla 4). Todos los ratones inmunizados con toxoide quimérico inoculados posteriormente con Stx1 o Stx2 sobrevivieron durante todo el periodo de 14 días de observación. Nueve de los diez ratones inmunizados con toxoide quimérico que fueron posteriormente inoculados con Stx1 y Stx2 sobrevivieron. El ratón inmunizado con toxoide quimérico que sucumbió después de la inoculación con dosis letales de ambos Stx1 y Stx2 fue el ratón que tampoco produjo anticuerpos de neutralización anti-Stx1 y anti-Stx2; este ratón murió en aproximadamente el mismo tiempo que lo hicieron los animales ficticiamente inmunizados. LD₅₀ se determinó previamente que fuera 125 y 1 ng/ratón para Stx1 y Stx2. El peso medio de los ratones cuando fueron inoculados era de 40,4 g.

| Grupo | Inmunogen | Inoculación con 10 LD ₅₀ | # supervivientes en total |
|-------|---------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| A | PBS | Stx1 | 0/10 |
| B | StxA2/StxB1 toxoide | Stx1 | 10/10 |
| C | PBS | Stx2 | 0/10 |
| D | StxA2/StxB1 toxoide | Stx2 | 10/10 |
| E | StxA2/StxB1 toxoide | Stx1 y Stx2 | 9/10 |

Ejemplo 6: determinación de anticuerpos anti-Stx1 o anti-Stx2 por ELISA

[0093] Ratones CD-1 macho fueron inmunizados y estimulados a intervalos de tres semanas bien con PBS o con el toxoide mutante triple. Después de la tercera y última estimulación, se recogió suero de cada ratón, y los títulos de anticuerpos IgG contra Stx1 y Stx2 se compararon con la muestra de suero preinmune apropiada por ELISA (véase figura 2).

[0094] Stx1 o Stx2 purificado (100 ng en 100 ml de PBS) se usó para revestir los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en forma de U (Thermo Electron), y las placas de microtitulación fueron incubadas a 4°C durante toda la noche. Las placas de microtitulación fueron luego lavadas tres veces en PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBST) y bloqueadas durante toda la noche a 4°C con 200 µl por pocillo de PBST que contenía 3% de

albúmina de suero bovino. El día siguiente, en una placa de microtitulación separada, el suero pre y post inmunización de ratón se diluyeron en PBST, con una dilución inicial de 1:50 y 1:5 diluciones posteriormente. Después de que las placas de microtitulación bloqueadas fueran lavadas, 100 µl del suero diluido se usó como el anticuerpo primario para los ELISA, y las placas de microtitulación fueron incubadas durante dos horas a 37°C. Después, 100 µl del anticuerpo secundario, conjugado anti-ratón cabra IgG para HRP se añadió a una dilución de 1:3.000 en PBST, y las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 45 min. El anticuerpo secundario fue detectado con el equipo de sustrato de enzimoimmunoanálisis de peroxidasa TMB (Bio-Rad), y las placas de microtitulación fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir que se produjera un cambio de color. Cien µl de 1M de H₂SO₄ se añadió luego para templar la reacción, y el desarrollo de color se determinó por medición del OD₄₅₀. El título de ELISA fue definido como la dilución de suero que estaba por encima de ambos niveles de base y preinmunes. En casos donde los niveles preinmunes fueron más alto que los niveles post inmunes, un valor de 0,3 fue asignado como el título de ELISA. Estos ensayos fueron hechos una vez por duplicado. Los controles positivos para los ELISA anti-Stx1 y anti-Stx2 fueron bien 11E10 o 13C4 purificados (Hycult Biotechnology) como los anticuerpos primarios, cada uno diluido 1:20.000 en PBST.

Ejemplo 7: ensayos de neutralización de toxina Stx1 y Stx2 *in vitro*

[0095] Dado que los títulos de neutralización de toxina son más predictivos de una respuesta de protección para Stxs que los títulos de ELISA (Wen *et al.*, *supra*), también se realizaron ensayos de neutralización de células Vero contra Stx1 o Stx2 purificados *in vitro* en las muestras de suero.

[0096] Los sueros pre y post inmunización se usaron en un ensayo de neutralización para Stx1 y Stx2 como se mencionó previamente (Marques *et al.* (1986) J. Infect. Dis. 154, 338-41). El título de neutralización fue definido como la dilución del suero de ratón que neutralizaba 50% de la citotoxicidad de Stx1 o Stx2. La cantidad de Stx1 o Stx2 usada en estos ensayos fue 20 o 38 CD₅₀s respectivamente. En los casos donde el suero de ratón ficticiamente inmunizado o suero post inmunización no neutralizó Stx1 o Stx2, un valor de 0,3 fue asignado al título de neutralización. Estos ensayos fueron hechos una vez por duplicado.

Ejemplo 8: comparación de títulos de anticuerpo de neutralización a través de análisis estadístico

[0097] El ELISA anti-Stx1 o anti-Stx2 y los títulos de anticuerpo de neutralización *in vitro* de los grupos inmunizados con toxoide fueron comparados con los grupos ficticiamente inmunizados por la prueba t de dos lados utilizando el programa SPSS 12.0.1. La supervivencia de ratones inmunizados se comparó con los ratones ficticiamente inmunizados después de la inoculación con 10 LD₅₀s de bien Stx1 o Stx2 o Stx1 y Stx2 mediante la prueba exacta de FISHER. Estos resultados fueron considerados significativamente diferentes si el valor p fue < 0,05.

[0098] Los ratones preinmunes y ficticiamente inmunizados tenían bajos niveles de base de anticuerpos que reaccionaron con Stx1 o Stx2 (véase la figura 2). Todos menos un ratón inmunizado con el toxoide mostraron títulos de IgG altos tanto para Stx1 como Stx2, 4,4 y 4,1 logs por encima de la base, respectivamente. Cuando los títulos de ELISA de los ratones inmunizados con toxoide fueron comparadas con los ratones ficticiamente inmunizados, se descubrió que los resultados eran significativo (p<0,001).

[0099] No se detectaron anticuerpos de neutralización medibles para Stx1 o Stx2 en ratones preinmunes o ficticiamente inmunizados (véase la figura 3). En cambio, todos menos un ratón inmunizado con el toxoide mostró títulos de neutralización para Stx1 y Stx2 (véase la figura 3). Los títulos anti-Stx1 y anti- Stx2 de neutralización medios fueron 2,9 y 1,9 logs por encima de la base. Los títulos de neutralización Stx2 inferiores pueden ser atribuibles a la mayor concentración de Stx2 que de Stx1 usada en los ensayos de neutralización (aproximadamente 38 CD₅₀s en comparación con 20 CD₅₀s, respectivamente). El ratón inmunizado con toxoide que mostró un pobre título de ELISA anti-Stx1 tampoco produjo anticuerpos de neutralización contra cualquier toxina. Cuando los títulos de neutralización de los ratones inmunizados con toxoide fueron comparadas con los ratones ficticiamente inmunizados, los resultados resultaron ser significativamente diferentes (p<0,001).

Listado de secuencias

[0100]

<110> THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION Smith, Michael J O'Brien, Alison D Teel, Louise D Melton-Celsa, Angela

<120> Proteínas de toxoide de Shiga quiméricas

<130> 044508-5015-WO

<150> US 60/773.658

<151> 2006-02-16

<160> 24
<170> Versión de patentIn 3.4
5 <210> 1
<211> 1442
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> StxA2/StxB1 quimérico

<220>
15 <221> CDS
<222> (87).. (977)

<220>
20 <221> CDS
<222> (1050)..(1256)

<400> 1

ES 2 532 985 T3

| | |
|--|-----|
| ggatcctaag gaggacagct atgaagtgta tattatttaa atgggtactg tgccctgttac | 60 |
| tgggttttttc ttcggtatcc tattcc cgg gag ttt acg ata gac ttt tcg acc | 113 |
| Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr | |
| 1 5 | |
| caa caa agt tat gtc tct tcg tta aat agt ata cgg aca gag ata tcg | 161 |
| Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser | |
| 10 15 20 25 | |
| acc cct ctt gaa cat ata tct cag ggg acc aca tcg gtg tct gtt att | 209 |
| Thr Pro Leu Glu His Ile Ser Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile | |
| 30 35 40 | |
| aac cac acc cca ccg ggc agt tat ttt gct gtg gat ata cga ggg ctt | 257 |
| Asn His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu | |
| 45 50 55 | |
| gat gtc tat cag gcg cgt ttt gac cat ctt cgt ctg att att gag caa | 305 |
| Asp Val Tyr Gln Ala Arg Phe Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln | |
| 60 65 70 | |
| aat aat tta tca gtg gcc ggg ttc gtt aat acg gca aca aat act ttc | 353 |
| Asn Asn Leu Ser Val Ala Gly Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe | |

ES 2 532 985 T3

| 75 | 80 | 85 | |
|---|----|----|------|
| tac cgt ttt tca gat ttt aca cat ata tca gtg ccc ggt gtg aca acg Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Thr His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr 90 95 100 105 | | | 401 |
| gtt tcc atg aca acg gac agc agt tat acc act ctg caa cgt gtc gca Val Ser Met Thr Thr Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala 110 115 120 | | | 449 |
| gcg ctg gaa cgt tcc gga atg caa atc agt cgt cac tca ctg gtt tca Ala Leu Glu Arg Ser Gly Met Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser 125 130 135 | | | 497 |
| tca tat ctg gcg tta atg gag ttc agt ggt aat aca atg acc aga gat Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp 140 145 150 | | | 545 |
| gca tcc aga gca gtt ctg cgt ttt gtc act gtc aca gca caa gcc tta Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Gln Ala Leu 155 160 165 | | | 593 |
| tta ttc agg cag ata cag aga gaa ttt cgt cag gca ctg tct gaa act Leu Phe Arg Gln Ile Gln Arg Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr 170 175 180 185 | | | 641 |
| gct cct gtg tat acg atg acg ccg gga gac gtg gac ctc act ctg aac Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr Pro Gly Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn 190 195 200 | | | 689 |
| tgg ggg cga atc agc aat gtg ctt ccg gag tat cgg gga gag gat ggt Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly 205 210 215 | | | 737 |
| gtc aga gtg ggg aga ata tcc ttt aat aat ata tca gcg ata ctg ggg Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly 220 225 230 | | | 785 |
| act gtg gcc gtt ata ctg aat tgc cat cat cag ggg gcg cgt tct gtt Thr Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val 235 240 245 | | | 833 |
| cgc gcc gtg aat gaa gag agt caa cca gaa tgt cag ata act ggc gac Arg Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu Cys Gln Ile Thr Gly Asp 250 255 260 265 | | | 881 |
| agg cct gtt ata aaa ata aac aat aca tta tgg gaa agt aat aca gct Arg Pro Val Ile Lys Ile Asn Asn Thr Leu Trp Glu Ser Asn Thr Ala 270 275 280 | | | 929 |
| gca gcg ttt ctg aac aga aag tca cag ttt tta tat aca acg ggt aaa Ala Ala Phe Leu Asn Arg Lys Ser Gln Phe Leu Tyr Thr Thr Gly Lys 285 290 295 | | | 977 |
| taagggggta aatgaaaa aacattatta atagctgcat cgctttcatt tttttcagca | | | 1037 |
| agtgcgctgg cg acg cct gat tgt gta act gga aag gtg gag tat aca aaa Thr Pro Asp Cys Val Thr Gly Lys Val Glu Tyr Thr Lys 300 305 310 | | | 1088 |
| tat aat gat gac gat acc ttt aca gtt aaa gtg ggt gat aaa gaa tta | | | 1136 |

ES 2 532 985 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Tyr | Asn | Asp | Asp | Asp | Thr | Phe | Thr | Val | Lys | Val | Gly | Asp | Lys | Glu | Leu | | |
| | | | | 315 | | | | | 320 | | | | | 325 | | | |
| ttt | acc | aac | aga | tgg | aat | ctt | cag | tct | ctt | ctt | ctc | agt | gcg | caa | att | | 1184 |
| Phe | Thr | Asn | Arg | Trp | Asn | Leu | Gln | Ser | Leu | Leu | Leu | Ser | Ala | Gln | Ile | | |
| | | | 330 | | | | | 335 | | | | | 340 | | | | |
| acg | ggg | atg | act | gta | acc | att | aaa | act | aat | gcc | tgt | cat | aat | gga | ggg | | 1232 |
| Thr | Gly | Met | Thr | Val | Thr | Ile | Lys | Thr | Asn | Ala | Cys | His | Asn | Gly | Gly | | |
| | | 345 | | | | | 350 | | | | | 355 | | | | | |
| gga | ttc | agc | gaa | gtt | att | ttt | cgt | tgactcagaa | tagctcagtg | aaaatagcag | | | | | | | 1286 |
| Gly | Phe | Ser | Glu | Val | Ile | Phe | Arg | | | | | | | | | | |
| | 360 | | | | | 365 | | | | | | | | | | | |
| gcggagattc | ataaatgtta | aatacatctc | aattcagtca | gttggtgccg | gtctgataat | | | | | | | | | | | | 1346 |
| agatgtgtta | gaaaatttct | gcatggtgaa | tccccctgtg | cggaggggcg | actggtgaac | | | | | | | | | | | | 1406 |
| ggtatgatct | ctttgatgat | cgtaagcgag | aattcg | | | | | | | | | | | | | | 1442 |

<210> 2
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 2

ES 2 532 985 T3

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

ES 2 532 985 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| | 115 | | 120 | | 125 | | | | | | | | | | | | | | |
| Gln | Ile | Ser | Arg | His | Ser | Leu | Val | Ser | Ser | Tyr | Leu | Ala | Leu | Met | Glu | | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | | |
| Phe | Ser | Gly | Asn | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Ala | Ser | Arg | Ala | Val | Leu | Arg | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | |
| Phe | Val | Thr | Val | Thr | Ala | Gln | Ala | Leu | Leu | Phe | Arg | Gln | Ile | Gln | Arg | | | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | |
| Glu | Phe | Arg | Gln | Ala | Leu | Ser | Glu | Thr | Ala | Pro | Val | Tyr | Thr | Met | Thr | | | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | | |
| Pro | Gly | Asp | Val | Asp | Leu | Thr | Leu | Asn | Trp | Gly | Arg | Ile | Ser | Asn | Val | | | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | | | |
| Leu | Pro | Glu | Tyr | Arg | Gly | Glu | Asp | Gly | Val | Arg | Val | Gly | Arg | Ile | Ser | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | | |
| Phe | Asn | Asn | Ile | Ser | Ala | Ile | Leu | Gly | Thr | Val | Ala | Val | Ile | Leu | Asn | | | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | | |
| Cys | His | His | Gln | Gly | Ala | Arg | Ser | Val | Arg | Ala | Val | Asn | Glu | Glu | Ser | | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | |
| Gln | Pro | Glu | Cys | Gln | Ile | Thr | Gly | Asp | Arg | Pro | Val | Ile | Lys | Ile | Asn | | | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | | |
| Asn | Thr | Leu | Trp | Glu | Ser | Asn | Thr | Ala | Ala | Ala | Phe | Leu | Asn | Arg | Lys | | | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | | | |
| Ser | Gln | Phe | Leu | Tyr | Thr | Thr | Gly | Lys | | | | | | | | | | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | | | | | | | | | |

<210> 3
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 3

ES 2 532 985 T3

Thr Pro Asp Cys Val Thr Gly Lys Val Glu Tyr Thr Lys Tyr Asn Asp
 1 5 10 15
 Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly Asp Lys Glu Leu Phe Thr Asn
 20 25 30

Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Leu Ser Ala Gln Ile Thr Gly Met
 35 40 45

Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly Gly Gly Phe Ser
 50 55 60

Glu Val Ile Phe Arg
 65

- 5 <210> 4
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador
- <400> 4
 gatcggatcc ccctgtaacg aagtttgcgt aacagc 36
- 15 <210> 5
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador
- <400> 5
 gatcgaattc tcgcttacga tcatcaaaga gatcatacc 39
- 25 <210> 6
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Cebador
- <400> 6
 gatcggatcc agcaagggcc accatatcac ataccgcc 38
- 35 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Cebador
- 45 <400> 7
 caggggaatt caccatgcga aatttttta acaaatgc 38
- <210> 8

ES 2 532 985 T3

<211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 8
 gggggtaaaa tgaaaaaac attattaata gc 32

10 <210> 9
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

<400> 9
 20 gctattaata atgtttttt cattttacc ccttattac ccgttgata taaaaactg 59

<210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 10
 30 tcagtgccg gggtcgtaa tacgg 25

<210> 11
 <211> 61
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 11
 40 ccgtattaac gaaccggcc actgataaat tattttgctc aataatcaga cgaagatggt 60

c 61

<210> 12
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 12
 50 caagccttat tattcaggca gatacagaga gaatttcgctc aggc 44

<210> 13
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

| | | | |
|----|---|----|----|
| | <400> 13 | | |
| | ctctgtatct gcctgaataa taaggcttgt gctgtgacag tgacaaaacg cagaactgct | | 60 |
| | ctgg | | 64 |
| 5 | <210> 14 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia artificial | | |
| 10 | <220> <223> Cebador | | |
| | <400> 14 gatcggatcc taaggaggac agctatgaag tgtatattat ttaatgggt actg | 54 | |
| 15 | <210> 15 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial | | |
| 20 | <220> <223> Cebador | | |
| 25 | <400> 15 gatcatgat agccaaaagg aacacctga tatg | 34 | |
| | <210> 16 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial | | |
| 30 | <220> <223> Cebador | | |
| 35 | <400> 16 gatcgctagc tcaacgaaaa ataactcgc tgaatcc | 37 | |
| | <210> 17 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial | | |
| 40 | <220> <223> Cebador | | |
| 45 | <400> 17 caggccttat tattcaggca g | 21 | |
| | <210> 18 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial | | |
| 50 | <220> <223> Cebador | | |
| 55 | <400> 18 ctgcctgaat aataaggcct gtgctgtgac agtgacaaaa cgcagaactg ctctggatgc | 60 | |
| 60 | <210> 19 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial | | |

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 19
 ggtggtggtg acgaaaaata acttcgctga atcc 34

<210> 20
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 20
 cagtgggtgt ggtggtggtg acgaaaaata ac 32

<210> 21
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

25 <400> 21
 gatcgaattc tcagtgggtg tgggtggtg g 31

<210> 22
 <211> 29
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 22
 40 catcacgata cctttacagt taaagtggg

<210> 23
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 23
 50 ttaactgta aaggtatcgt gatgattata tttgtatac tccacc 46

<210> 24
 <211> 17
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de Shine-Dalgarno

60 <400> 24
 taaggaggac agctatg 17

REIVINDICACIONES

1. Proteína quimérica que comprende:
- 5 (i) al menos un polipéptido StxA2, que es la subunidad A de una toxina Stx2, con una sustitución en cada posición que corresponde a los residuos nativos tirosina 77, ácido glutámico 167 y arginina 170 del polipéptido StxA2 de SEC ID n°: 2, donde dichas sustituciones reducen o eliminan la actividad enzimática del polipéptido StxA2, y
- 10 (ii) al menos un polipéptido StxB1 nativo, que es la subunidad B de una toxina Stx1.
2. Composición que comprende la proteína quimérica según la reivindicación 1.
3. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína quimérica según la reivindicación 1.
- 15 4. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 3.
5. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 4.
6. Método para producir un polipéptido que comprende el cultivo de una célula huésped transformada con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3 bajo condiciones en las que la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico es expresada.
- 20 7. Proteína quimérica según la reivindicación 1 o una composición según la reivindicación 2 para su uso como un medicamento.
- 25 8. Uso de una proteína quimérica según la reivindicación 1 o una composición según la reivindicación 2 para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la diarrea y/o el síndrome urémico hemolítico en un mamífero.
- 30 9. Proteína quimérica según la reivindicación 1 o una composición según la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento o la prevención de la diarrea y/o el síndrome urémico hemolítico en un mamífero.
- 35 10. Uso según la reivindicación 8 o una proteína quimérica para su uso según la reivindicación 9, donde la diarrea es diarrea asociada a una infección de *Escherichia coli* que produce la toxina de Shiga.
11. Uso o proteína quimérica para su uso o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde el mamífero es un humano.
- 40 12. Proteína quimérica según la reivindicación 1, donde la sustitución en el residuo 77 del polipéptido StxA2 es una sustitución Y77S.
13. Proteína quimérica según la reivindicación 1, donde la sustitución en el residuo 167 del polipéptido StxA2 es una sustitución E167Q.
- 45 14. Proteína quimérica según la reivindicación 1, donde la sustitución en el residuo 170 del polipéptido StxA2 es una sustitución R170L.
- 50 15. Proteína quimérica según la reivindicación 1, donde la sustitución en el residuo 77 del polipéptido StxA2 es una sustitución Y77S, la sustitución en el residuo 167 del polipéptido StxA2 es una sustitución E167Q y la sustitución en el residuo 170 del polipéptido StxA2 es una sustitución R170L.

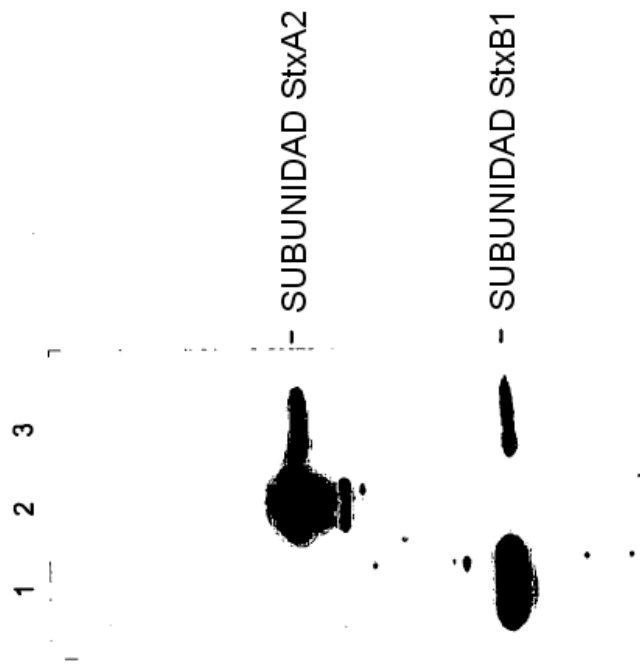


FIG. 1

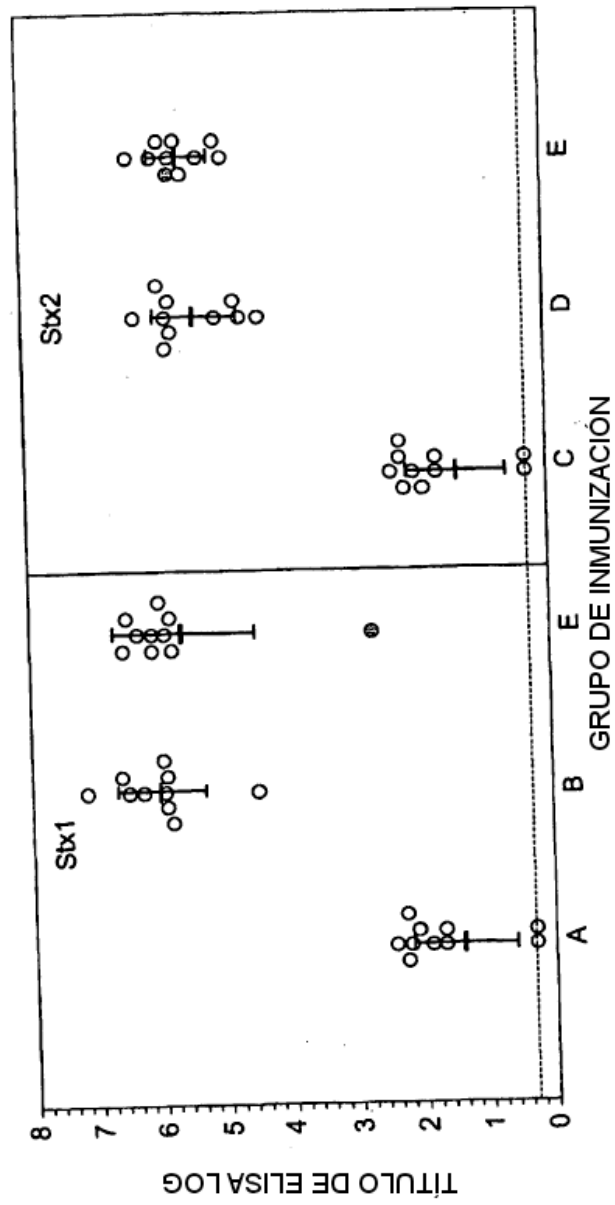


FIG. 2

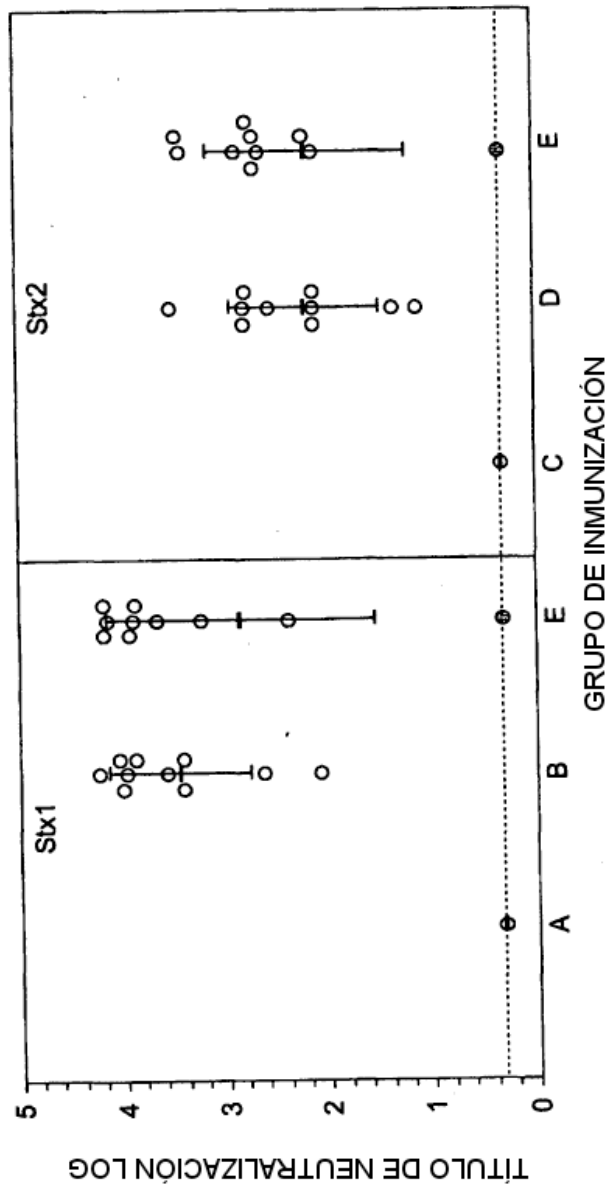


FIG. 3