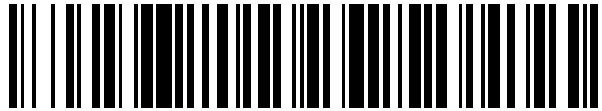


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 454**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2012 E 12756469 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2750701**

54 Título: **Método para aumentar la presentación de antígeno CS6 de ETEC sobre la superficie celular y productos que pueden obtenerse del mismo**

30 Prioridad:

**12.09.2011 SE 1150821**  
**12.09.2011 US 201161533405 P**

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

**04.02.2016**

73 Titular/es:

**SCANDINAVIAN BIOPHARMA HOLDING AB**  
**(100.0%)**  
**Gunnar Asplunds Allé 16**  
**171 63 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**CARLIN, NILS;**  
**SVENNERHOLM, ANN-MARI y**  
**TOBIAS, JOSHUA**

**ES 2 558 454 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

Método para aumentar la presentación de antígeno CS6 de ETEC sobre la superficie celular y productos que pueden obtenerse del mismo.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos útiles en la preparación de antígeno CS6 de ETEC, en particular para la fabricación de vacunas, así como células y vacunas que pueden obtenerse a través del método.

**Antecedentes**

El antígeno de superficie de Coli 6 (CS6) es uno de los factores de colonización (CF) no fimbriales más frecuentes de las bacterias *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC), que son la causa más común de diarrea entre lactantes y niños en países en vía de desarrollo y en viajeros que viajan a tales zonas.

Dado que la protección inmunitaria contra ETEC está mediada principalmente por anticuerpos anti-IgA producidos localmente en el intestino, se ha centrado mucho esfuerzo en el desarrollo de una vacuna oral a base de CF. Se han desarrollado vacunas candidatas contra ETEC que inducen respuestas inmunitarias anti-CF, por ejemplo en forma de una vacuna oral CF-ETEC + CTB combinada que contenía cinco cepas de ETEC inactivadas que expresan varios de los CF que se encuentran más comúnmente, es decir CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS4 y CS5, junto con la subunidad B de la toxina colérica recombinante (CTB, que es altamente homóloga a la subunidad B de LT de ETEC) (Levine MM, Giron JA, Noriega F. Fimbrial vaccines. En: P. Klemm editor. Fimbriae: adhesion, biogenics, genetics and vaccines, CRC Press, Boca Raton, Fla.1994, págs. 255-70; Svennerholm A-M, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. Expert Rev Vaccines 2008; 7:795-804).

Un trabajo previo ha descrito la preparación de cepas de vacuna candidata contra *E. coli* que expresan cantidades inmunogénicas de antígenos CF fimbriales tales como CFA/I y CS2, que se mantienen tras el tratamiento con formalina. Sin embargo, hasta la fecha han fallado los intentos por generar cantidades inmunogénicas de CS6 que expresan *E. coli* y por conservar la actividad inmunológica de la proteína CS6 en una vacuna de células enteras inactivada, (documento WO - A - 2007/089205).

En el presente documento se describe la construcción de una cepa de *E. coli* no toxigénica recombinante, con un marcador de selección no antibiótico thyA, que expresa grandes cantidades de antígeno CS6 sobre la superficie bacteriana, y muestra que la inactivación con fenol de las bacterias no destruye las propiedades del antígeno CS6. Por el contrario, se encontró inesperadamente que el tratamiento con fenol aumentó significativamente la cantidad de antígeno presentado en la superficie celular. Este aumento es muy relevante, dado que el número de células que pueden incluirse en una vacuna de células enteras oral es un factor limitante principal en el desarrollo de vacunas, debido al hecho de que números demasiado grandes de bacterias administradas por vía oral dan lugar a efectos adversos tales como vómitos, especialmente en sujetos lactantes. Al aumentar la cantidad de antígeno presentado por célula, puede aumentarse la cantidad de antígeno(s) en la vacuna sin aumentar el número global de células en la vacuna.

La inmunización oral de ratones con tales bacterias *E. coli* que sobreexpresan CS6 inactivadas con fenol indujo fuertes respuestas de anticuerpos anti-IgA fecales e intestinales y de anticuerpos anti-IgG+IgM de suero frente a CS6 que superaban las respuestas inducidas por una cepa de referencia de ETEC que expresa de manera natural CS6 y se usaba previamente como cepa de vacuna. Los datos indican que la cepa de *E. coli* que sobreexpresa CS6 y no toxigénica inactivada con fenol descrita es un componente útil en una vacuna contra ETEC oral.

**Definiciones**

En el contexto de la presente divulgación, los términos a continuación tienen los siguientes significados.

La abreviatura *ETEC* se refiere a bacterias *Escherichia coli* enterotoxigénicas.

El término *antígeno CS6* significa antígeno de superficie de Coli 6, uno de los factores de colonización no fimbrial más frecuentes de bacterias ETEC. Se usa como sinónimo el término *antígeno CS6 de ETEC*.

El término *vacuna de células enteras inactivada* se refiere una vacuna que contiene bacterias enteras (intactas) pero inactivadas (no vivas).

El término *marcador de selección no antibiótico* se refiere a marcadores de selección genética para la selección de plásmidos que no requieren el uso de antibióticos en el proceso de selección. Los ejemplos incluyen complementación con thyA (timidinilato sintetasa).

**Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Construcción de pJT-CS6-thyA para la expresión de CS6. En primer lugar se construyó el plásmido pJT-CFA/I-ThyA (A) y después se reemplazó el operón CFA/I por el operón CS6 amplificado entero, creando pJT-CS6-thyA (B).

Figura 2: Expresión en superficie de CS6 en la cepa recombinante de C600-CS6 y la cepa de referencia de CS6 E11881/23 examinada mediante transferencia de puntos (A) y ELISA de inhibición (B). Ambas cepas se cultivaron en medio CFA líquido, la cepa recombinante se indujo con IPTG, ambas se lavaron y se sometieron a prueba en diluciones en serie a una densidad inicial de  $10^9$  bacteria/ml. \*\*P<0,01 mediante la prueba de la t de Student, de dos colas.

Figura 3: Títulos de IgG+IgM de suero y de IgA de ELISA con extractos fecales e intestinales frente a CS6, tras la inmunización oral de ratones C57 Bl/6 con los mismos números de bacterias C600-CS6 inactivadas con fenol y bacterias E11881/23 (n=5 ratones/grupo). Se muestran los títulos como media geométrica (MG) + error estándar (EE) para los ratones en cada grupo; para los extractos fecales e intestinales se ajustan los niveles con respecto a los niveles de IgA total en los extractos. Los controles se refieren a los niveles de anticuerpo en ratones antes de la inmunización. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, mediante la prueba de la t de Student, de dos colas.

**Sumario de la invención**

En un primer aspecto, se da a conocer un método para aumentar la presentación de antígeno CS6 de ETEC sobre la superficie celular, que comprende la etapa de poner en contacto células que expresan dicho antígeno con una disolución acuosa que comprende el 0,6-2,2 por ciento de fenol en peso, de modo que la presentación de dicho antígeno se aumenta en al menos el 100%, preferiblemente al menos el 200%, más preferiblemente al menos el 300%.

Preferiblemente, la duración de la etapa de puesta en contacto es de 1 a 72 h. Más preferiblemente, la duración de la etapa de puesta en contacto es de 1,5 a 42 h.

Preferiblemente, la temperatura durante la etapa de puesta en contacto es de 18 de 42°C, más preferiblemente de 18 a 38°C, incluso más preferiblemente de 18-22°C o 36-38°C.

Preferiblemente, la concentración de fenol es del 0,8-2,0 por ciento en peso, más preferiblemente del 1,0 - 2,0 por ciento en peso.

Preferiblemente, las células comprenden células de *Escherichia coli*. Preferiblemente, el antígeno se sobreexpresa de manera recombinante por las células.

Preferiblemente, el método del primer aspecto comprende además la etapa de comparar la presentación del antígeno por las células con la presentación de antígeno CS6 por células sin tratar pero por lo demás comparables por medio de un ELISA de inhibición o una transferencia de puntos, preferiblemente ELISA de inhibición.

En un segundo aspecto, también se da a conocer un método para la fabricación de una vacuna de células enteras inactivada para una inmunización contra ETEC que expresa CS6, que comprende el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de fenol, la temperatura de contacto y el tiempo de contacto se eligen de modo que se produce una inactivación de al menos  $10^7$  veces de las células de manera concomitante con el aumento en presentación de antígeno CS6.

Preferiblemente, en el método del segundo aspecto, la concentración de fenol es del 0,6-2,0 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de 6-72 h y la temperatura de contacto es de 18-22°C. Más preferiblemente, la concentración de fenol es del 0,75-0,85 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de  $40 \pm 2$  h y la temperatura de contacto es de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

En un tercer aspecto, se da a conocer una célula que puede obtenerse mediante el método según los aspectos primero o segundo.

En un cuarto aspecto, se da a conocer una vacuna para una inmunización contra ETEC que expresa CS6, que comprende células del tercer aspecto.

**Descripción detallada**Método para aumentar la presentación de antígeno CS6

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la presentación de antígeno CS6 de ETEC sobre una superficie celular, caracterizado porque comprende la etapa de poner en contacto una célula o

- células que expresa(n) dicho antígeno con una disolución acuosa que comprende el 0,6-2,2 por ciento de fenol en peso, a una temperatura adecuada y durante un tiempo adecuado, de modo que la presentación de dicho antígeno se aumenta en al menos el 20%. Con el aumento de al menos el 20% en la presentación de antígeno quiere decirse que la cantidad de antígeno presente en la superficie celular y detectable mediante métodos adecuados (véase más adelante para detalles) al menos se duplica en comparación con células que no se han sometido al método pero que son por lo demás comparables. Preferiblemente, el aumento en la presentación de antígeno es de al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90%, más preferiblemente de al menos el 100%, el 125%, el 150%, el 175%, el 200%, el 250% o el 300%. Lo más preferiblemente, el aumento es de al menos el 100%.
- La disolución acuosa puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) con fenol añadido, pero son adecuados muchos tampones acuosos diferentes. Es preferible que el pH de los tampones sea de 5-9, más preferiblemente de 6-8, lo más preferiblemente de 6,5 a 7,5. La concentración de sal del tampón es preferiblemente de 50-200 mM, más preferiblemente de 100-150 mM y lo más preferiblemente de aproximadamente 137 mM. Un tampón de PBS adecuado puede ser tal como sigue: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, en 1 litro, pH 7,4.
- Las variables concentración de fenol, temperatura y tiempo presentan un cierto grado de interdependencia. Si se aumenta la temperatura, se requieren una concentración de fenol menor y/o un tiempo más corto para conseguir la presentación aumentada (y viceversa). Si se prolonga el tiempo de tratamiento, pueden utilizarse una concentración de fenol menor y/o una temperatura menor (y viceversa). Ayudado por la orientación de las enseñanzas en el presente documento, el experto podrá usar experimentación rutinaria sin carga significativa para adaptar la combinación de concentración de fenol, tiempo y temperatura a las necesidades en cuestión.
- La duración adecuada para el tratamiento puede ser de 0,1 a 240 h o de 1 a 240 h. Preferiblemente, el tiempo de tratamiento puede ser de 1 a 72 h. Más preferiblemente, el tiempo de tratamiento puede ser de 1,5 a 42,0 h. Lo más preferiblemente, el tiempo de tratamiento es de 2,0-40,0 h.
- La temperatura adecuada para el tratamiento está en el intervalo de 1-45°C o 4-45°C. Preferiblemente, la temperatura puede ser de 18 a 42°C. Desde el punto de vista práctico, puede ser preferible realizar el método a temperatura ambiental (ambiente) para evitar la necesidad de equipos especializados para mantener la temperatura. Por tanto, un intervalo de temperatura preferido es de 18-25°C, incluso más preferiblemente de 18-22°C, lo más preferiblemente de aproximadamente 20°C. También puede ser preferible realizar el método a una temperatura elevada para acortar la duración del procedimiento y/o para reducir la concentración de fenol requerida. Por tanto, otro intervalo de temperatura preferido es de 35-42°C, incluso más preferiblemente de 36-38°C, lo más preferiblemente de aproximadamente 37°C.
- La concentración de fenol puede estar preferiblemente en el intervalo del 0,7 al 2,0 por ciento en peso, más preferiblemente el 0,75 - 2,0 por ciento en peso, aún más preferiblemente el 0,8-2,0 por ciento en peso, todavía más preferiblemente el 0,85-2,0 por ciento en peso, incluso más preferiblemente el 0,9-2,0 por ciento en peso y lo más preferiblemente el 1,0-2,0 por ciento en peso. En una realización preferida, la concentración de fenol es del 0,6-2,0 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de 6-72 h y la temperatura de contacto es de 18-22°C. En otra realización preferida, la concentración de fenol es del 0,6-2,0 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de 2-4 h y la temperatura de contacto es de 36-38°C.
- Las células en el método anterior pueden ser células de *Escherichia coli*. Esto puede ser ventajoso desde el punto de vista práctico dado que *E. coli* se hace crecer y se manipula genéticamente de manera sencilla en el laboratorio. Además, el propósito principal del método es proporcionar vacunas contra ETEC, por lo que puede ser ventajoso usar un huésped de *E. coli* para el antígeno para proporcionar un contexto más natural para el antígeno que está presentándose. Preferiblemente, las células son células de *E. coli* no toxigénicas. No obstante, debe entenderse que el método también puede usarse con otras células que expresan CS6.
- La concentración de células no es crucial dentro de límites razonables. Cualquier concentración de hasta 10<sup>12</sup> células/ml se considera factible. Un intervalo de concentración de células preferible práctico puede ser de 10<sup>8</sup>-10<sup>12</sup> células/ml. El intervalo más preferible es de 10<sup>9</sup> a 2·10<sup>10</sup> células/ml.
- La producción de antígeno CS6 de ETEC puede inducirse de manera recombinante en la célula, por medio de modificación mediante ingeniería genética (véase el ejemplo 1). Esto facilita la producción de altos niveles del antígeno por célula, ventajosos para minimizar el número de células necesarias para una dosis de vacuna, conduciendo a efectos adversos minimizados. No obstante, el método también puede usarse con células que expresan de manera nativa (es decir sin ninguna modificación mediante ingeniería genética) el antígeno CS6. Sin embargo, las células del método son preferiblemente células huésped de *E. coli* no toxigénicas que sobreexpresan antígeno CS6 como resultado de la transformación con un plásmido que expresa CS6. Preferiblemente, el plásmido tiene un marcador de selección no antibiótico, es decir un marcador de selección que no requiere el uso de antibióticos para su función. Lo más preferiblemente, las células huésped son auxotróficas para la timidina y el plásmido que sobreexpresa CS6 porta un factor de complementación de timidinato sintetasa (ThyA), por lo cual la selección puede llevarse a cabo usando un medio que carece de timidina. Preferiblemente, la sobreexpresión de

CS6 se promueve mediante un promotor tac o un fuerte promotor inducible similar ampliamente conocido en la técnica.

En cuanto a la medición de la presentación aumentada del antígeno CS6 como resultado del método de la invención, se dan a conocer métodos útiles en el presente documento y también se conocen de la bibliografía. Preferiblemente, la determinación se realiza usando un ensayo ELISA de inhibición tal como se da a conocer en el presente documento (véanse el ejemplo 2 y los materiales y métodos asociados), o por medio de una transferencia de puntos también dada a conocer en el presente documento (véase el ejemplo 2). Preferiblemente, el método del primer aspecto comprende las etapas adicionales de analizar la cantidad de presentación del antígeno CS6 por las células (por ejemplo, usando las técnicas anteriores) y comparar la cantidad presentada con la cantidad de antígeno CS6 presentada por células que no se sometieron al tratamiento con disolución acuosa que comprende fenol pero que por lo demás son comparables. De manera adecuada, parte de las células se dejan a un lado y se almacenan antes de la etapa de puesta en contacto para servir como muestra de control como tal.

#### 15 Método para la fabricación de una vacuna

En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la fabricación de una vacuna de células enteras inactivada para una inmunización contra ETEC que expresa CS6, que comprende el método según el primer aspecto, en el que la concentración de fenol, la temperatura de contacto y el tiempo de contacto se eligen de modo que se produce una inactivación de al menos  $10^7$  veces de las células de manera concomitante con el aumento en presentación de antígeno CS6. Preferiblemente, el grado de inactivación es de al menos  $10^8$  veces, más preferiblemente  $10^9$  veces, aún más preferiblemente  $10^{10}$  veces y lo más preferiblemente no hay células viables presentes tras el tratamiento. La inactivación celular puede determinarse mediante cualquier medio común conocido en la técnica. Un método adecuado se da a conocer en el presente documento en la sección titulada Materiales y métodos.

La utilización de fenol para la inactivación celular así como para aumentar la presentación de antígeno puede ser ventajosa, dado que esto reduce el número de etapas de procedimiento en la fabricación de la vacuna. La inactivación con fenol también soluciona el problema que resulta de la propensión del antígeno CS6 a ser destruido por el método de inactivación preferible normalmente, el tratamiento con formalina (véase el ejemplo 2).

Preferiblemente, en el método del segundo aspecto, la concentración de fenol es de 0,6-2,0 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de 6-72 h y la temperatura de contacto es de 18-22°C. Un conjunto de condiciones preferido alternativo es aquel en el que la concentración de fenol es del 0,6-2,0 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de 2-4 h y la temperatura de contacto es de 36-38°C. Aún otro conjunto de condiciones preferido es aquel en el que la concentración de fenol es del 1,1-1,3 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de  $16 \pm 3$  h y la temperatura de contacto es de  $20 \pm 2$ °C. Todavía otro conjunto de condiciones preferido es aquel en el que la concentración de fenol es del 1,1-1,3 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de  $40 \pm 8$  h y la temperatura de contacto es de  $20 \pm 2$ °C. Un conjunto de condiciones preferido adicional es aquel en el que la concentración de fenol es del 1,4-1,6 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de  $6 \pm 2$  h y la temperatura de contacto es de  $20 \pm 2$ °C. Aún un conjunto de condiciones preferido adicional es aquel en el que la concentración de fenol es del 0,75-0,85 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de  $40 \pm 2$  h y la temperatura de contacto es de  $20 \pm 1$ °C.

#### 45 Células y vacunas que pueden obtenerse a través del método de la invención

En un tercer aspecto, se proporciona una célula que puede obtenerse mediante el método según los aspectos primero o segundo. El tratamiento con fenol da como resultado un cambio evidente en la estructura de la pared celular y/o el antígeno de modo que más del antígeno está más disponible para la detección (tanto *in vitro*, por ejemplo mediante anticuerpos, como *in vivo* mediante el sistema inmunitario). En otras palabras, la célula bacteriana así tratada ha adquirido una estructura novedosa por medio del método de los aspectos primero o segundo, aunque no es factible describir el cambio en la estructura en términos estructurales.

En un cuarto aspecto se proporciona una vacuna para una inmunización contra ETEC que expresa CS6, que comprende células según el tercer aspecto.

#### 55 **Ejemplos**

Para detalles sobre los procedimientos experimentales relacionados con los ejemplos, se remite al lector a la sección titulada Materiales y métodos.

#### 60 Ejemplo 1: Expresión de CS6 en C600-CS6 de *E. coli*.

Se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN que portaba los genes estructurales (*cssA*, *cssB*, *cssC*, *cssD*) para CS6, preparado a partir de una cepa de ETEC de tipo natural con expresión en superficie de CS6, y se clonó para construir el vector de expresión pJT-CS6-ThyA, tal como se ilustra en las figuras 1A y 1B. Después se sometió

este plásmido a electroporación en la cepa C600- $\Delta$ thyA de *E. coli* no toxigénica, dependiente de timina, y se indujo la expresión en superficie de CS6 mediante la adición de IPTG al medio de crecimiento, tal como se muestra en un ensayo de inmunotransferencia de puntos (figura 2A). No se observó expresión de CS6 en ausencia del inductor (datos no mostrados). Al examinar la expresión de CS6 mediante la cepa C600-CS6 recombinante usando el ensayo de transferencia de puntos, se encontró que esta cepa expresaba niveles al menos 8 veces mayores de CS6 en comparación con la cepa de referencia de CS6 E11881/23, que se había usado previamente como cepa de vacuna CS4+CS6 en la vacuna CF-CTB-EPEC (figura 2A). De la misma manera, también al determinar específicamente la expresión en superficie de CS6 usando un ensayo ELISA de inhibición, se encontró una cantidad aproximadamente 10 veces mayor de CS6 en la cepa recombinante en comparación con la cepa de referencia (figura 2B).

#### Ejemplo 2: Inactivación de bacterias sin destruir las propiedades del antígeno CS6.

Con el objetivo de inactivar las bacterias que expresan CS6 al tiempo que se conservan las propiedades del antígeno CS6 en su superficie, se compararon los efectos del formaldehído y del fenol. Estudios preliminares mostraron que el tratamiento de las bacterias con el 0,3% o el 0,6% de formaldehído, a la vez de inactivar de manera segura las bacterias, daba como resultado una pérdida completa de antígeno CS6 detectable (datos no mostrados). Por el contrario, el tratamiento de las bacterias con el 0,5% de fenol no sólo inactivaba las bacterias sometidas a prueba, sino que también conservaba el antígeno CS6 (datos no mostrados); por otro lado, una menor concentración de fenol sometida a prueba, el 0,25%, no dio como resultado una inactivación completa de las bacterias. Estos resultados indicaban que el tratamiento con fenol podía ser útil para inactivar las bacterias al tiempo que conservaba el antígeno CS6. Para encontrar un método de inactivación óptimo, se sometieron a prueba por tanto diferentes concentraciones de fenol para la inactivación tanto de la cepa C600-CS6 recombinante como, para su comparación, otra cepa que sobreexpresaba CS6 (TOP10-CS6-Amp). Como se observa en la tabla 2, con ambas cepas sometidas a prueba con el 0,5%, el 0,8%, el 1%, y el 1,6%, pero no con el 0,25%, de fenol, se inactivaron las bacterias y también se conservó el CS6 de superficie, tal como se sometió a prueba mediante ELISA de inhibición. Se encontró el nivel máximo de CS6 cuando se inactivaron las bacterias con el 0,8% de fenol, tratamiento que de hecho aumentó de manera reproducible las cantidades estimadas de antígeno CS6 de superficie en comparación con las bacterias sin tratar (tabla 2). Basándose en estos resultados, se usó por tanto fenol a la concentración del 0,8% para inactivar tanto C600-CS6 como la cepa de referencia E11881/23, lo que dio como resultado bacterias inactivadas con cantidades 6 veces mayores de CS6 en la cepa recombinante que en la cepa de referencia, tal como se sometió a prueba mediante ELISA de inhibición. Después se usaron estas bacterias inactivadas para inmunizaciones orales de ratones.

Tabla 2 – Niveles de CS6 de superficie y falta de crecimiento de cepas C600-CS6 y TOP10-CS6-Amp, tras la inactivación con diferentes concentraciones de fenol.

Fenol	CS6 ( $\mu\text{g}/10^9$ bacterias) <sup>a</sup>		Crecimiento <sup>b</sup>	
	C600-CS6	TOP10-CS6-Amp	C600-CS6	TOP10-CS6-Amp
0	0,61 $\pm$ 0,038	0,39 $\pm$ 0,054	+	+
0,25%	0,55 $\pm$ 0,037	0,30 $\pm$ 0,06	+	+
0,5%	0,53 $\pm$ 0,046	0,77 $\pm$ 0,084	-	-
0,8%	2,03 $\pm$ 0,23	2,36 $\pm$ 0,206	-	-
1,0%	1,92 $\pm$ 0,18	1,87 $\pm$ 0,13	-	-
1,6%	1,15 $\pm$ 0,11	0,89 $\pm$ 0,082	-	-

<sup>a</sup> Se midieron niveles de CS6 de superficie mediante ELISA de inhibición tal como se describe en materiales y métodos; los valores son la media  $\pm$  EE de cuatro determinaciones.

<sup>b</sup> Tras la inactivación con fenol, se sometieron a prueba las bacterias tratadas para determinar la esterilidad (es decir, la falta de crecimiento) tal como se describe en materiales y métodos; - indica ausencia de crecimiento, y + indica crecimiento.

#### Ejemplo 3: Inmunogenicidad de C600-CS6 inactivada con fenol en ratones.

En una primera prueba de la inmunogenicidad de la cepa recombinante C600-CS6 se inmunizaron grupos de ratones tanto Balb/C como C57 Bl/6 con el mismo número de bacterias inactivadas con fenol, y se compararon las respuestas de anticuerpo sérico frente a CS6, tal como se midió mediante ELISA. Aunque se indujeron respuestas anti-CS6 significativas en ambos tipos de ratones, las respuestas de anticuerpo en ratones C57 Bl/6 fueron sustancialmente mayores que en los ratones Balb/C (datos no mostrados). Por tanto, se usaron ratones C57 Bl/6 para los estudios de inmunización oral adicionales en los que se comparó la inmunogenicidad de preparación de vacuna inactivada con fenol, administrada por vía oral, de C600-CS6 y la cepa de referencia E11881/23. Los resultados mostraron que todos los ratones inmunizados respondieron con la producción de anticuerpos anti-IgG+IgM de suero frente a CS6, y que los títulos de los anticuerpos frente a CS6 eran en promedio más de 60 veces mayores en ratones inmunizados con bacterias C600-CS6 que aquellos en ratones inmunizados con la cepa de referencia E11881/23 (figura 3). También se examinaron las respuestas de anticuerpo anti-IgA fecal e intestinal frente a CS6 (figura 3). En ambos casos, la cepa C600-CS6 recombinante indujo significativamente, en promedio, niveles 75 veces mayores de anticuerpos anti-IgA fecal e intestinal frente a CS6 en comparación con los niveles en ratones inmunizados con la cepa de referencia correspondiente; la última cepa sólo indujo niveles de IgA anti-CS6

de mucosa ligeramente mayores que los observados en ratones de control no inmunizados.

Ejemplo 4: Optimización del tratamiento con fenol que aumenta la presentación de antígeno CS6 a 20°C

5 Se cultivó la cepa C600-CS6 durante la noche (16-18 h) en un agitador rotatorio (150 rpm) a 37°C. Se diluyeron alícuotas del cultivo durante la noche 1/100 y se incubó el cultivo resultante durante 2 h tal como anteriormente, tras lo cual se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de CS6. Después se incubó adicionalmente el cultivo en las mismas condiciones durante 6 h más. Después se recogieron las bacterias, se lavaron dos veces con PBS (para evitar la presencia de cualquier residuo del medio) y volvieron a suspenderse en PBS hasta una densidad de DO600=16 (que corresponde a aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  bacterias/ml).

15 Se dividió el cultivo bacteriano ajustado según la DO, inducido, en 8 matraces de 250 ml, que contenían cada uno 25 ml del cultivo bacteriano. Como tiempo cero (es decir, bacterias sin tratar) se tomó una parte para el recuento de viables. Se añadieron veinticinco (25) ml de fenol a la concentración final de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,5, o 2,0 (por ciento en peso) a los matraces, seguido por la incubación de todos los matraces durante 1 h, 2 h, 6 h, 16 h y 40 h, a temperatura ambiente con 80 rpm. Tras cada punto de tiempo, se retiró 1 ml de cada suspensión bacteriana (con fenol) de cada matraz a un tubo Eppendorf. Se recogieron las bacterias, se lavaron meticulosamente dos veces con PBS (para evitar la presencia de cualquier residuo del fenol) y volvieron a suspenderse con 1 ml de PBS. Se almacenaron las suspensiones a 4°C y se usaron para ELISA de inhibición. Se muestran los resultados en la tabla 3.

20 Tabla 3 – Niveles de CS6 de superficie en la cepa C600-CS6, tras la inactivación con diferentes concentraciones de fenol para diferentes momentos a 20°C.

Fenol	CS6 ( $\mu\text{g}/10^9$ bacterias) <sup>a</sup>			
	Tiempos de incubación			
	0 h	6 h	16 h	40 h
0	0,3			
0,6%		0,17	0,28	0,73
0,8%		0,28	0,77	0,89
1,0%		1,1	0,93	1,06
1,2%		1,67	2,2	1,36
1,5%		2,75	1,71	1,14
2,0%		1,57	0,91	0,37

<sup>a</sup> Se midieron los niveles de CS6 de superficie mediante ELISA de inhibición tal como se describe en materiales y métodos. Los valores son la media de dos determinaciones.

25 Ejemplo 5: Tratamiento con fenol que aumenta la presentación de antígeno CS6 y que simultáneamente inactiva bacterias a escala industrial

30 Se inoculó un fermentador de 500 litros con una cepa de *E. coli* que sobreexpresaba el antígeno CS6 (ETEX 24). Tras inducir la expresión mediante IPTG, se continuó con la fermentación durante 8 horas. Se recogieron las bacterias y se lavaron sobre un ultrafiltro de 500 kD y finalmente se dispensaron a una concentración de  $20 \times 10^9$  bacterias/ml. Se añadió fenol hasta una concentración final del 0,8% (p/v) y se mantuvo la suspensión a 20°C durante 40 horas con agitación constante. Se lavó la suspensión sobre una membrana de ultrafiltración de 500 kD en solución salina tamponada con fosfato y se almacenó a 4°C.

35 Durante el procedimiento de inactivación se tomaron muestras antes de la inactivación y después de 1, 2, 18 y 40 horas de inactivación para someter a prueba la viabilidad. En resumen, se lavaron las muestras tomadas mediante centrifugación y volvieron a suspenderse en el volumen original en PBS, tras lo cual se prepararon diluciones en PBS y se sembraron en placa sobre agar para factor de colonización (agar CFA). Se incubaron las placas a 37°C y se hizo el recuento al día siguiente.

40 Se realizó un ELISA de inhibición para cuantificar la cantidad de antígeno CS6 en material nuevo antes de la inactivación y material inactivado lavado.

45 Resulta claramente evidente que pueden conseguirse simultáneamente la inactivación celular eficaz y una presentación de antígeno CS6 aumentada a una escala de producción industrial (tabla 4).

Tabla 4: Evolución en el tiempo para la inactivación a 20°C

Tiempo de inactivación (h)	0	1	2	18	40
CS6 total ( $\mu\text{g}/10^9$ células)	2,51	Nd	Nd	Nd	5,36
CS6 unido ( $\mu\text{g}/10^9$ células)	1,01	Nd	Nd	Nd	2,90
Células viables (ufc/ml)	$1,64 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	0	0

Nd = no determinado

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y cultivo. Las cepas bacterianas usadas en este estudio se enumeran en la tabla 1. Se usó una cepa de *E. coli* C600- $\Delta$ thyA no toxigénica, que es auxotrófica para la timina (N.I.A. Carlin y M. Lebens, sin publicar) para la construcción de la cepa C600-CS6 candidata para la vacuna. Se usó la cepa de ETEC E11881/23, que se había usado previamente como cepa que expresa CS4+CS6 en la vacuna CF-ETEC + CTB, como cepa de referencia. Para la expresión de CS6, se hicieron crecer bacterias en medio CFA (Evans DG, Evans DJ Jr., Clegg S, Pauley JA. Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1979;25:738-48), complementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) cuando era necesario.

Tabla 1 - Lista de cepas, plásmidos y cebadores usados en este estudio

Cepas, plásmido y cebadores	Característica relevante	Referencia/fuente
Cepas: GB35 de ETEC E11881/23 de <i>E. coli</i> TOP10-CS6-Amp C600- $\Delta$ thyA de <i>E. coli</i> C600-CFA/I C600-CS6	CS6 <sup>+</sup> , LT <sup>+</sup> , CS4 <sup>+</sup> CS6 <sup>+</sup> , LT <sup>-</sup> , ST <sup>-</sup> TOP10 que expresa CS6, Amp <sup>r</sup> Auxotrófica para timina; Kan <sup>r</sup> C600- $\Delta$ thyA/pJT-CFA/I-ThyA C600- $\Delta$ thyA/pJT-CS6-ThyA	Nicklasson <i>et al.</i> Microb Pathog. 2008;44:246-54. Tobias <i>et al.</i> Vaccine 2008;26:5373-80 NIA Carlin y M Lebens Este estudio Este estudio
Plásmido: pJT-CFA/I-Cm pNC-4 pJT-CFA/I-ThyA pJT-CS6-ThyA	9041 pb 5086 pb; thyA 8879 pb; thyA 7973 pb; thyA	Tobias <i>et al.</i> Vaccine 2010;28:6977-84. NIA Carlin Este estudio Este estudio
Cebadores: P1 P2 P3 P4	5'-CGGTCTCCCTAGGCCTCCTTACCTATGGTGATC (SEQ ID NO: 1) 5'-CGGTCTCCTCGAGCGACTCTAGACCTAACCG (SEQ ID NO: 2) 5'-CGGTCTCGAATTCTAATGGTGTATATGAAGAAAACAATTG (SEQ ID NO: 3) 5'-CGGTCTCAAGCTTAACATTGTTTATTACAACAGATAATTGTTTG (SEQ ID NO: 4)	

Construcción del vector de expresión pJT-CS6-ThyA. Para la construcción de la cepa recombinante C600-CS6, se generó en primer lugar el plásmido pJT-CFA/I-ThyA. Se digirió el plásmido pJT-CFA/I-Cm (Tobias J, Holmgren J, Hellman M, Nygren E, Lebens M, Svennerholm A-M. Over-expression of major colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*, alone or together, on non-toxigenic *E. coli* bacteria. Vaccine 2010;28:6977-84) con *Xho*I y *Avr*II para eliminar el gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*). Después se usó el plásmido pNC-4 (N.I.A. Carlin; sin publicar) en una reacción de PCR para amplificar el gen *thyA* (de *Vibrio cholerae*). El cebador directo P1 (SEQ ID NO: 1) era homólogo a una secuencia que comienza 98 pb en el sentido de 5' de *thyA* y tenía sitios de restricción para *Eco*311 y *Avr*II, y el cebador inverso P2 (SEQ ID NO: 2) era homólogo a una secuencia que terminaba 75 pb en el sentido de 3' de *thyA*, y tenía sitios de restricción para *Eco*311 y *Xho*I, en el extremo 5' (tabla 1). Las condiciones de PCR eran las siguientes: 95°C durante 5 min, 31 ciclos de 94°C durante 15 s, 58°C durante 30 s y 72°C durante 50 s, con una extensión final de 7 min a 72°C. El fragmento de 1065 pb resultante que contenía *thyA* se sometió después a extracción en gel y se escindió con *Xho*I y *Avr*II. El ligamiento de la *thyA* amplificada y digerida con el pJT-CFA/I-Cm digerido, dio como resultado pJT-CFA/I-ThyA (figura 1A). Después se sometió este plásmido a electroporación en C600- $\Delta$ thyA de *E. coli* y se aisló una cepa recombinante (C600- $\Delta$ thyA/pJT-CFA/I-ThyA).

Después se construyó el plásmido pJT-CS6-ThyA en dos etapas (figura 1B). En primer lugar, se digirió el plásmido pJT-CFA/I-ThyA con *Eco*RI e *Hind*III. Se usó PCR para amplificar el operón CS6 de la cepa de ETEC que expresa CS6 GB35 (Nicklasson M, Sjöling A, Lebens M, Tobias J, Janzon A, Brive L, Svennerholm A-M. Mutations in the periplasmic chaperone leading to loss of surface expression of the colonization factor CS6 in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clinical isolates. Microb Pathog. 2008;44:246-54). Se llevó a cabo la amplificación usando los cebadores directo e inverso P3 (SEQ ID NO: 3) y P4 (SEQ ID NO: 4), respectivamente (tabla 1) y el sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche Diagnostics GmbH). P3 es homólogo a una secuencia que comienza 13 pb en el sentido de 5' de *cssA* y porta sitios de restricción para *Eco*RI y *Eco*311, mientras que P4, que es homólogo a una secuencia que termina 2 pb en el sentido de 3' de *cssD*, porta sitios de restricción para *Hind*III y *Eco*311, en el extremo 5' (figura 1B). Las condiciones de PCR eran tal como se describieron anteriormente (Tobias J, Lebens M, Källgård S, Nicklasson M, Svennerholm A-M. Role of different genes in the CS6 operon for surface expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor CS6. Vaccine 2008; 26:5373-80). Después se restringió el operón CS6 amplificado, 4135 pb, con *Eco*311, dando como resultado un fragmento con *Eco*RI e *Hind*III flanqueantes, que se ligó con el pJT-CFA/I-ThyA digerido dando como resultado un plásmido pJT-CS6-ThyA de 7973 pb. Se sometió el plásmido pJT-CS6-ThyA construido a electroporación en la cepa C600- $\Delta$ thyA. Se examinaron las colonias resultantes para determinar la presencia del operón CS6 mediante PCR usando los cebadores P3 y P4. Se



analizaron adicionalmente clones positivos mediante un análisis de restricción de plásmidos aislados, y también mediante la capacidad de crecer en medio CFA que confirma su independencia de la timina. Se seleccionó un clon de este tipo como cepa positiva para CS6 e independiente de timina, y se designó C600-CS6 (es decir C600- $\Delta$ thyA/pJT-CS6-ThyA).

5 Expresión de CS6. Se cultivaron las cepas que expresan CS6 en medio CFA, durante la noche (16-18 h) en un agitador rotatorio (150 rpm) a 37°C. Se diluyeron alícuotas de los cultivos durante la noche 1/100 en medio CFA y se incubaron los cultivos resultantes durante 2 h tal como anteriormente. Al cultivo de la cepa recombinante se le añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de CS6 y después se incubaron  
10 adicionalmente los cultivos en las mismas condiciones durante 6 h más. Después se recogieron las bacterias y volvieron a suspenderse en PBS hasta una densidad de DO600=0,8 (que corresponde a aproximadamente 10<sup>9</sup> bacterias/ml).

15 Cuantificación de CS6 en la cepa recombinante. Se usó un anticuerpo monoclonal específico (Acm 2a:14) frente a CS6 (Helander A, Grewal HM, Gaastra W, Svennerholm A-M. Detection and characterization of the coli surface antigen 6 of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains by using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1997; 35:867-72) para cuantificar el nivel de expresión de CS6 mediante las cepas C600-CS6 recombinante y E11881/23 de referencia de ETEC, usando métodos de transferencia de puntos y ELISA de inhibición, tal como se describió (Tobias J, Holmgren J, Hellman M, Nygren E, Lebens M, Svennerholm A-M. Over-expression of major colonization  
20 factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*, alone o together, on non-toxigenic *E. coli* bacteria. Vaccine 2010;28:6977-84 y Tobias J, Lebens M, Bölin I, Wiklund G, Svennerholm A-M. Construction of non-toxic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* strains expressing high and immunogenic levels of enterotoxigenic *E. coli* colonization factor I fimbriae. Vaccine 2008;26:743-52).

25 Preparación de bacterias inactivadas. Se sometieron a prueba formaldehído y fenol, y se compararon para determinar la inactivación de las cepas que expresan CS6. Se añadieron formaldehído, en concentraciones finales del 0,3% (p/v; 0,1 M) o del 0,6% (0,2 M), y fenol en concentraciones finales del 0,25%-1,6% (p/v; 0,026-0,17 M), a cultivos bacterianos a una densidad de 10<sup>10</sup> bacterias/ml en PBS. Se incubaron las suspensiones durante 2 h a 37°C con agitación a 60 rpm y después se mantuvieron a 4°C durante 3 días sin agitación. Después se centrifugaron las  
30 suspensiones bacterianas, se lavaron y volvieron a suspenderse en el mismo volumen de PBS y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. En ambos métodos de inactivación, se extendieron 0,1 ml de cada suspensión sobre agar sangre y se incubaron a 37°C durante hasta una semana para comprobar la falta de crecimiento. Antes de usarse para inmunización oral, se comprobó el nivel de CS6 en las bacterias inactivadas mediante ELISA de inhibición.

35 Inmunizaciones de ratones y recogida de muestras. Se usaron grupos de ratones Balb/C y C57 Bl/6 hembra (Charles River; 6-8 semanas de edad; 5 ratones/grupo) para inmunizaciones orales (intragástricas). Se administraron a todos los ratones dos dosis de 3 x 10<sup>8</sup> bacterias inactivadas con fenol (inactivadas, usando una concentración de fenol del 0,8%) de o bien C600-CS6 o bien la cepa de referencia junto con 7,5 µg de CT con dos días de separación en 0,3 ml de disolución de bicarbonato de sodio al 3% por vía intragástrica a través de un catéter para alimentación de bebés (primera ronda de inmunización), seguido dos semanas después por dos  
40 inmunizaciones idénticas con dos días de separación en una segunda ronda de inmunización. Se realizaron sangrados antes de la primera inmunización y dos semanas después de la última inmunización, momentos en los que también se recogieron los sedimentos fecales (FP) y se prepararon extractos tal como se describió anteriormente (Nygren E, Holmgren J, Attridge SR. Murine antibody responses following systemic or mucosal immunization with viable or inactivated *Vibrio cholerae*. Vaccine 2008;26:6784-90). Además, en el punto de tiempo posterior cuando se sacrificaron los ratones, se perfundieron con una disolución de heparina-PBS para eliminar la sangre de los tejidos, y se recogió tejido de intestino delgado y se extrajo con una disolución de saponina-PBS al 2% (p/v) (el método Perfext) tal como se describió anteriormente Villavedra M, Carol H, Hjulstrom M, Holmgren J, Czerkinsky C. "PERFEXT": a direct method for quantitative assessment of cytokine production *in vivo* at the local  
50 level. Res Immunol 1997;148:257-66).

ELISA. Se determinaron los títulos de anticuerpo anti-IgG+IgM y anti-IgA frente a CS6 en sueros, extractos fecales e intestinales, mediante ELISA, tal como se describió anteriormente (Rudin A, Svennerholm A-M. Colonization factor antigens (CFAs) of enterotoxigenic *Escherichia coli* can prime and boost immune responses against heterologous  
55 CFAs. Microb Pathog 1994;16:131-9). Se purificó CS6, para su uso como antígeno de recubrimiento (a la concentración final de 0,7 µg/ml) en ELISA, a partir de la cepa que sobreexpresa TOP10-CS6 descrita anteriormente (Tobias J, Lebens M, Källgård S, Nicklasson M, Svennerholm A-M. Vaccine 2008;26:5373-80), mediante precipitación en sulfato de amonio y filtración en gel secuenciales. Se sometieron a prueba sueros de ratones individuales usando placas de microtitulación de adherencia baja (Greiner) y se diluyeron las muestras inicialmente 1/100 seguido por diluciones de tres veces en serie. Se sometieron a prueba extractos de sedimentos fecales y extractos de tejido de intestino delgado en placas de microtitulación de adherencia alta (Greiner) en 3 veces diluciones en serie a partir de una dilución de partida de 1/3. Se calcularon los títulos de anticuerpo como los recíprocos de las diluciones de muestra que dieron una absorbancia A450 de 0,4 por encima del valor de fondo. En las muestras de extractos fecales e intestinales, se midió también la IgA total mediante ELISA tal como se describió  
65 (Nygren E, Holmgren J, Attridge SR. Vaccine 2008;26:6784-90) y se expresaron los valores de anticuerpo anti-IgA específico de antígeno como unidades de titulación de IgA por µg de IgA total.

Análisis estadístico. Se realizaron todos los experimentos de ELISA al menos dos veces en diferentes ocasiones. Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante la prueba de la t de Student y se consideró  $P < 0,05$  (dos colas) como una diferencia significativa.

5

**Lista de secuencias**

10	<110> Scandinavian Biopharma Holding AB Svennerholm, Ann-Mari Tobias, Joshua Carlin, Nils	
	<120> Método para aumentar la presentación de antígeno CS6 de ETEC sobre la superficie celular y productos que pueden obtenerse del mismo	
15	<130> Documento P41100694US00	
	<160> 4	
20	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador artificial	
30	<400> 1 cggctccct aggcctcctt acctatggtg atc	33
	<210> 2	
	<211> 31	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador artificial	
40	<400> 2 cggctccct gagcgactct agacctaacc g	31
	<210> 3	
	<211> 41	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador artificial	
50	<400> 3 cggctcgaat tctaaggt gttatatgaa gaaaacaatt g	41
	<210> 4	
55	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador artificial	
	<400> 4 cggctcgaat ctaacattg ttatttaca acagataatt gtttg	45

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para aumentar la presentación de antígeno CS6 de ETEC sobre la superficie celular, que comprende la etapa de poner en contacto células que expresan dicho antígeno con una disolución acuosa que comprende el 0,6-2,2 por ciento de fenol en peso, de modo que la presentación de dicho antígeno se aumenta en al menos el 100%.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la presentación de dicho antígeno se aumenta en al menos el 200%.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la duración de la etapa de puesta en contacto es de 1 a 72 h.
4. Método según la reivindicación 3, en el que la duración de la etapa de puesta en contacto es de 1,5 a 42 h.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura durante la etapa de puesta en contacto es de 18 de 42°C.
6. Método según la reivindicación 5, en el que la temperatura durante la etapa de puesta en contacto es de 18 de 38°C.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de fenol es del 0,8-2,0 por ciento en peso.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células comprenden células de *Escherichia coli*.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno se sobreexpresa de manera recombinante por las células.
- 35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de comparar la presentación del antígeno por las células con la presentación de antígeno CS6 por células sin tratar pero por lo demás comparables por medio de un ELISA de inhibición o una transferencia de puntos.
- 40 11. Método para la fabricación de una vacuna de células enteras inactivada para una inmunización contra ETEC que expresa CS6, que comprende el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de fenol, la temperatura de contacto y el tiempo de contacto se eligen de modo que se produce una inactivación de al menos  $10^7$  veces de las células de manera concomitante con el aumento en presentación de antígeno CS6.
- 45 12. Método según la reivindicación 11, en el que la concentración de fenol es del 0,6-2,0 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de 6-72 h y la temperatura de contacto es de 18-22°C.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la concentración de fenol es del 0,75-0,85 por ciento en peso, el tiempo de contacto es de  $40 \pm 2$  h y la temperatura de contacto es de  $20 \pm 1$ °C.
- 50 14. Célula que puede obtenerse mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
15. Vacuna para una inmunización contra ETEC que expresa CS6, que comprende células según la reivindicación 14.

Fig. 1A

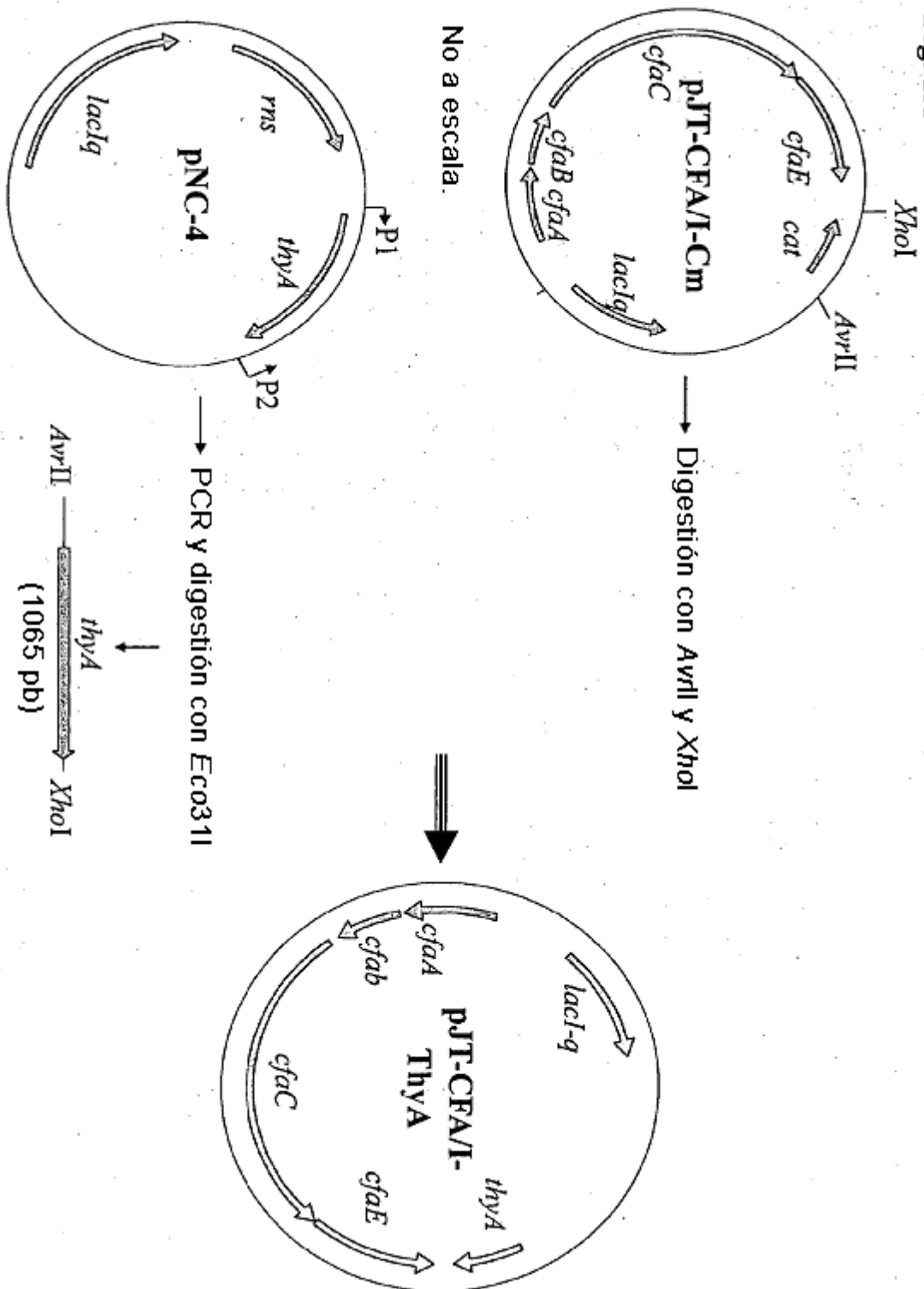
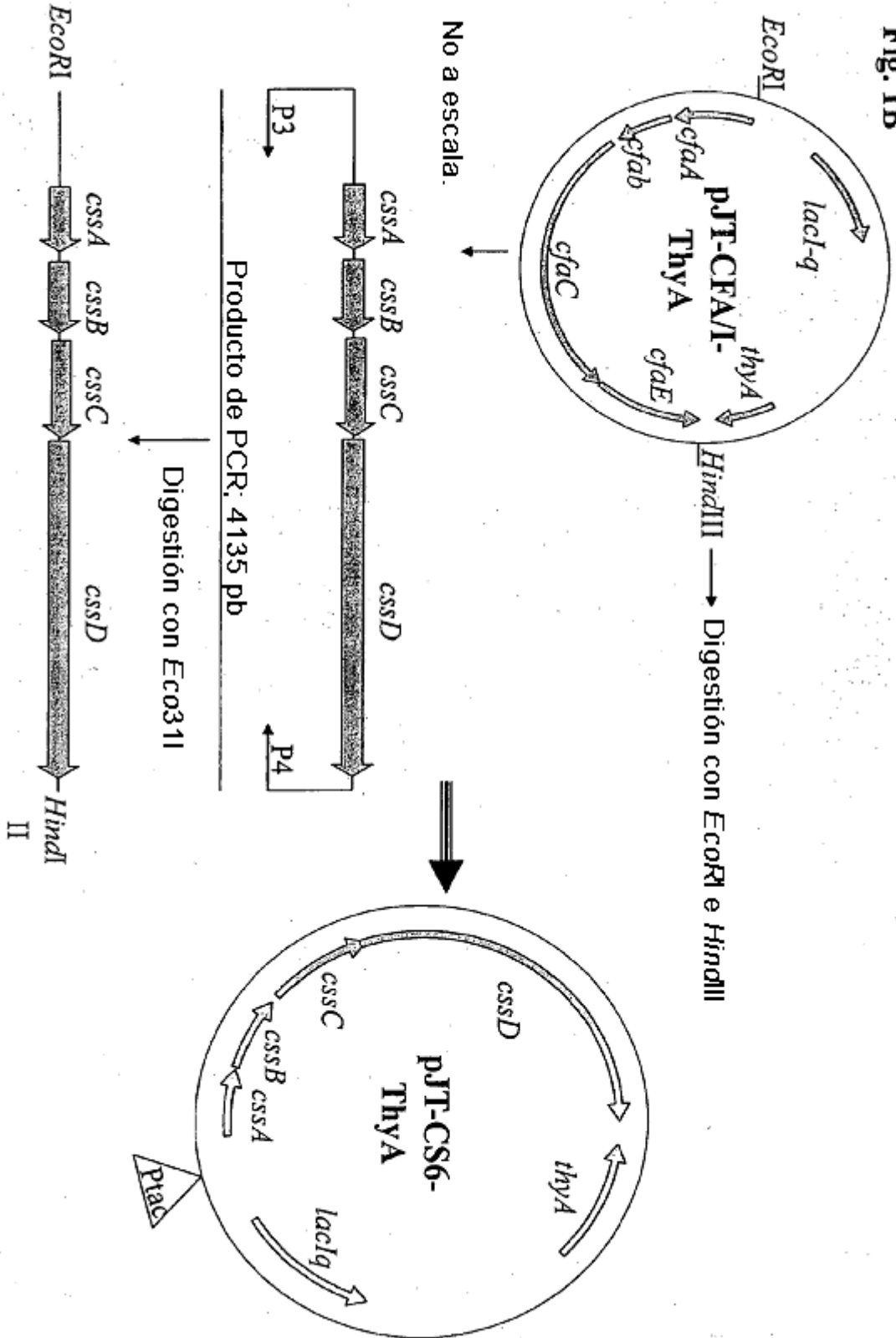
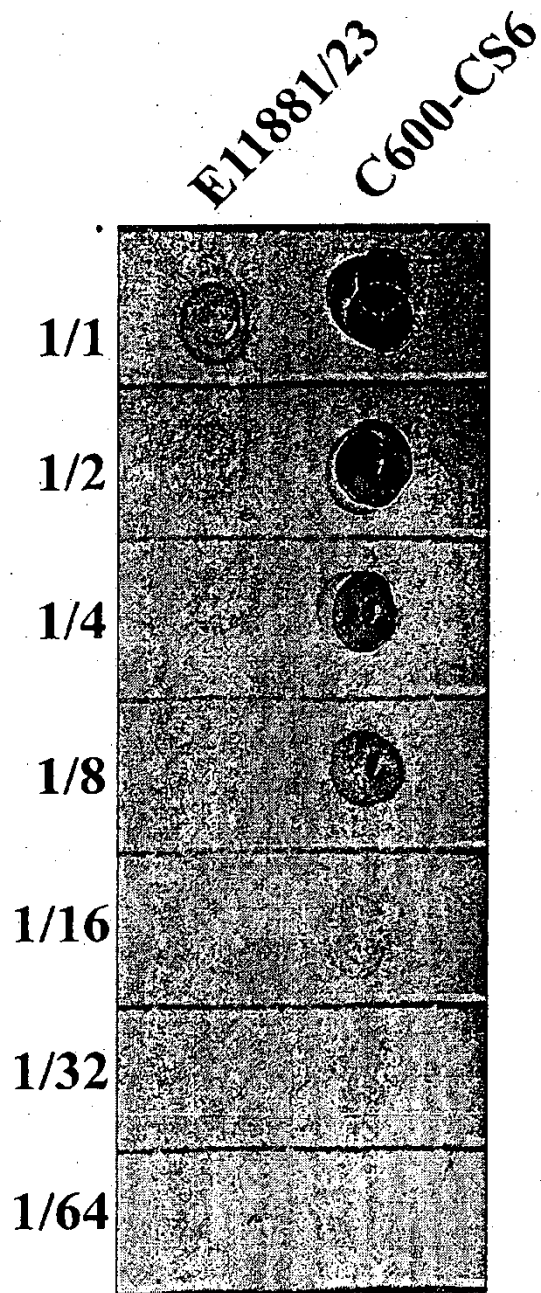


Fig. 1B





**FIG 2A**

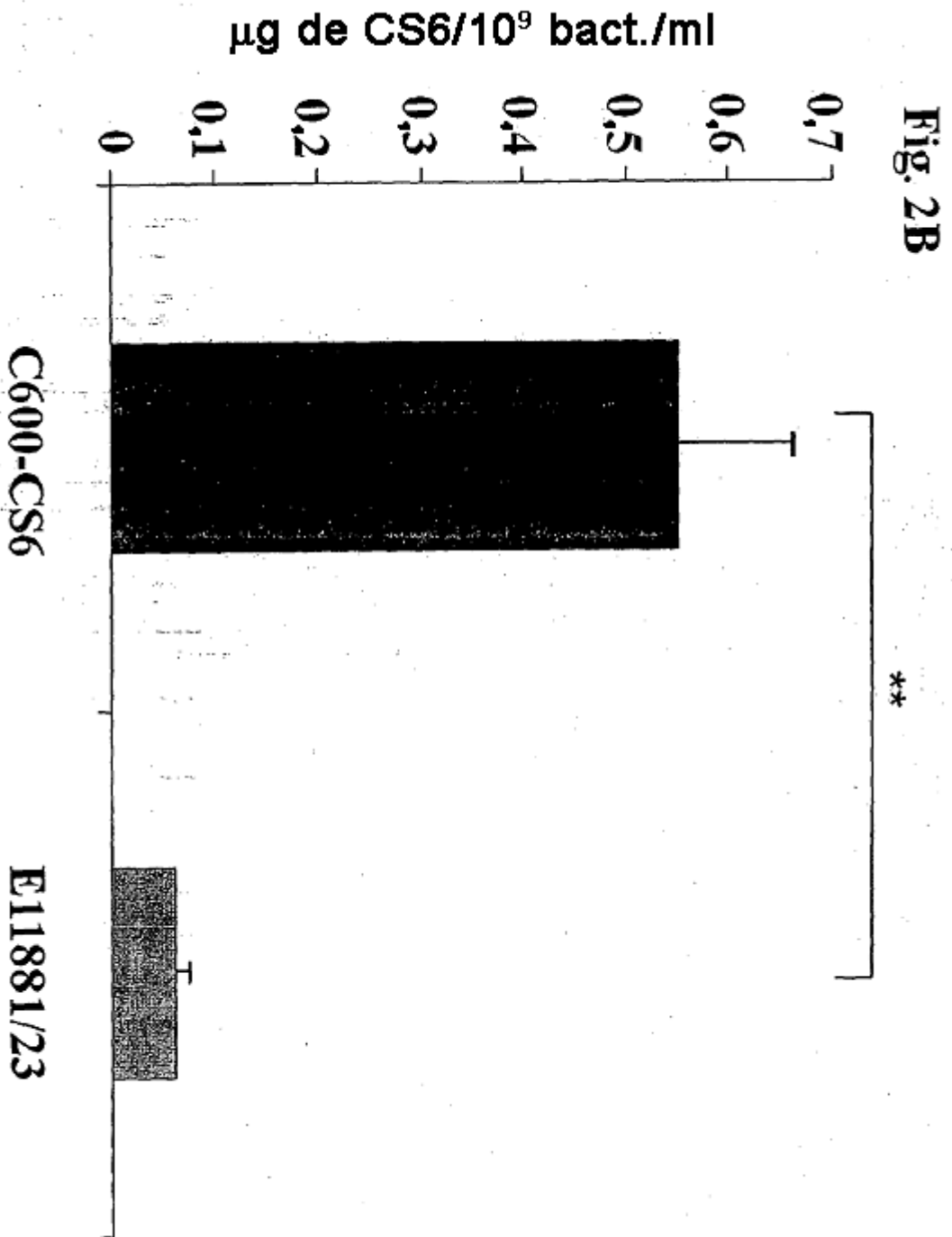


Fig. 3

