(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 595 363**

(51) Int. CI.:

C07K 14/245 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2006 E 11150423 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2351772**

(54) Título: **Sepsis asociada a las proteínas y los ácidos nucleicos de meningitis / Escherichia coli**

(30) Prioridad:

18.02.2005 US 654632 P
29.08.2005 US 712720 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2016

(73) Titular/es:

J. CRAIG VENTER INSTITUTE, INC. (50.0%)
9704 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US y
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (50.0%)

(72) Inventor/es:

BERLANDA SCORZA, FRANCESCO;
PIZZA, MARIAGRAZIA;
SERINO, LAURA;
MASIGNANI, VEGA;
TETTELIN, HERVE;
GOMES MORIEL, DANILO;
NORAIS, NATHALIE y
FONTANA, MARIA RITA

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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).

Sepsis asociada a las proteínas y los ácidos nucleicos de meningitis / Escherichia coli

Descripción

CAMPO TÉCNICO

[0001] Esta invención es en el campo de la biología *Escherichia coli*, y en particular se refiere a inmunógenos para su uso en la inmunización frente a cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* (ExPEC).

FONDO DE ARTE

[0002] Pocos microorganismos son tan versátiles como *E. coli*. Además de ser un miembro importante de la microflora intestinal normal de los mamíferos, que ha sido ampliamente explotado como un huésped en la tecnología del ADN recombinante. Además, sin embargo, *E. coli* puede ser también un patógeno mortal.

[0003] Cepas de *E. coli* se han clasificado tradicionalmente como comensales o patógenos, y las cepas patógenas son entonces sub-clasificadas como cepas intestinales o extraintestinales. La clasificación también puede estar basada en antígenos 'K'. El antígeno 'K' mejor estudiado es 'K1', el cual se considera el principal determinante de virulencia entre las cepas de *E. coli* que causan la meningitis neonatal. El antígeno K1 es un homopolímero de ácido siálico α-2,8-ligado, como el sacárido capsular del meningococo del serogrupo B.

[0004] Más recientes técnicas taxonómicas tales como la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) clasifican *E. coli* en cinco grupos filogenéticos (A, B1, B2, D y E), y estas agrupaciones no se ajustan a las tradicionales. Por ejemplo, el grupo B1 MLEE incluye tanto comensales como cepas patógenas, y el grupo D incluye tanto cepas intestinales como extraintestinales.

[0005] Las cepas patógenas extraintestinales (o cepas 'ExPEC' [1]) de *E. coli* se dividen en grupos B2 y D MLEE, e incluyen tanto las cepas de uropatógenos (UPEC) y cepas de meningitis/sepsis asociadas (MNEC). Cepas de UPEC causan infecciones del tracto urinario (ITU), y son una causa común de la cistitis. También causan pielonefritis (y sus complicaciones como sepsis) y las infecciones asociadas al catéter. Cepas MNEC causan la meningitis neonatal (0,1 casos por 1.000 nacidos vivos) con tasas de mortalidad que van desde 25 a 40%, y también son responsables de alrededor de 1/6 de los casos de sepsis.

[0006] La mayoría de las vacunas ExPEC anteriores se han basado en los lisados celulares o en las estructuras celulares. SOLCOUROVAC™ incluye diez bacterias muertas por calor diferentes, incluyendo seis cepas ExPEC, y se informó de un ensayo clínico de fase II exitoso en la referencia 2. URO-VAXOM™ es una vacuna de tableta oral que contiene lisados bacterianos liofilizados de 18 cepas de *E. coli* seleccionados **[3]**. Las vacunas de Baxter desarrollaron una vacuna contra la infección del tracto urinario en base a pili de 6 a 10 cepas diferentes, pero este producto ha sido abandonado. MedImmune desarrolló un producto llamado MEDI 516 basado en el complejo de adhesina FimH **[4]**, pero los ensayos clínicos de fase II muestran una eficacia inadecuada. Por otra parte, existía el riesgo que esta vacuna también afectaría cepas no patógenas de $FimH^{+ve}$ en la flora intestinal normal, y se esperaba que sería eficaz contra cepas de UPEC solamente, debido a su mecanismo de adherencia-vejiga específica, dejando otras cepas ExPEC incontroladas.

[0007] Hay por lo tanto una necesidad de vacunas de ExPEC mejoradas, incluyendo una necesidad de alejarse de lisados res celulas crudos y hacia moléculas mejor definidas, y la necesidad de identificar antígenos adicionales que son adecuados para su inclusión en las vacunas, en particular los antígenos que son frecuentes entre las cepas clínicas ExPEC sin ser también encontradas en cepas comensales. Dentro del grupo ExPEC, hay una necesidad particular para identificar antígenos adecuados para inmunizar contra cepas MNEC.

[0008] Se informó de una manera de abordar estas necesidades en la referencia 5, donde los inventores buscaron los genes presentes en los genomas de tipos MLEE B2 y D, pero ausentes de tipos MLEE A y B1. Otros enfoques comparativos, basados en la hibridación sustractiva, se han reportado en las referencias 6 y 7. Los genes de virulencia en cepas ExPEC también han sido identificados en referencia 8. La referencia 9 describe un análisis de cuatro islas de patogenicidad en la cepa UPEC de *E. coli* 536.

[0009] Referencia 10 utiliza la secuencia del genoma de UPEC(O6:K2:H1) cepa CFT073 [11,12] para identificar secuencias que no están presentes en cepas de *E. coli* no patógenas. La referencia 13 da a conocer una comparación de la secuencia de genoma de cepa de pielonefritis humana de *E. coli* 536 (O6: K15: H31), una UPEC, con datos de la secuencia para las cepas CFT073 (UPEC), EDL933 (enterohemorrágica) y MG1655 (cepa de laboratorio no patógena). Secuencias del genoma de cepas patógenas están disponibles en las bases de datos con los números de acceso AE005174, BA000007 y NC-004431. Una secuencia de una cepa no patógena está disponible bajo el número de acceso U00096.

[0010] Es un objeto de la invención proporcionar antígenos adicionales para su uso en la inmunización contra cepas de *E. coli* patógenas, en particular contra cepas ExPEC, y más particularmente contra las cepas MNEC.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0011] Los inventores han identificado varios marcos de lectura abiertos de una cepa de *E. coli* responsable de la meningitis neonatal (MNEC), y se ha identificado un subconjunto de estos que es de particular interés para la preparación de composiciones para inmunizar contra infecciones MNEC.

[0012] En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende: (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2; (c) una secuencia de aminoácido que es un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2; o (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y que incluye un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2, para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC. En una realización particular, los polipéptidos de este aspecto de la invención comprenden un fragmento que comprende al menos un epítopo de células B de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0013] Los polipéptidos de la invención pueden ser utilizados en la medicina y en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmune en un paciente.

[0014] La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de la invención, en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC. La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende dos o más polipéptidos de la invención, en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC. En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden además un adyuvante de vacuna.

[0015] La presente invención se puede utilizar para elevar una respuesta inmune en un paciente, que comprende la etapa de administración al paciente de una composición farmacéutica o composición inmunogénica de la invención. En una forma de realización particular, la respuesta inmunitaria es protectora contra la infección ExPEC, y en particular contra una infección MNEC.

[0016] Se describen a continuación otros aspectos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0017]

La Figura 1 muestra el % de supervivencia de los ratones con el tiempo después del desafío con IHE3034 después de la inmunización con IHE3034 inactivada por calor o con un control ('fisiol'), y también niveles de bacteriemia (ufc/ml) después de 24 horas.

La Figura 2 muestra el % de supervivencia de los ratones después del desafío con IHE3034 después de la inmunización ya sea con bacterias inactivadas por calor (arriba) o con vesículas (parte inferior) de mutantes ΔTolR. Los inmunógenos se prepararon a partir de la cepa IHE3034 o de una cepa de control (DH5).

La Figura 3 muestra el % de supervivencia de los ratones después del desafío con IHE3034 después de la inmunización con hierro o con un control (arriba) y el título del suero anti-IroN Ig (parte inferior).
La Figura 4 es similar a la Figura 3, pero para IbeA en lugar de IroN.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0018] Los inventores han identificado 4995 marcos de lectura abiertos de una cepa MNEC K1/ B2, y han identificado un subconjunto de estos que es de particular interés para la preparación de composiciones inmunogénicas contra las cepas MNEC.

Polipéptidos

[0019] La invención proporciona polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, como se describe en los ejemplos y en la Tabla 2, para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC.

[0020] La invención también proporciona un polipéptido codificado dentro de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC.

La secuencia de codificación en el ácido nucleico comienza preferiblemente con un codón de inicio y termina con un codón de parada. Los polipéptidos preferidos son aquellos no identificados en el ejemplo de la técnica anterior no identificado en cualquiera de las referencias 5, 6, 8, 10 y 11.

[0021] La invención también proporciona polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos descritas en los ejemplos para el uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC. Del mismo modo, la invención proporciona polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen identidad de secuencia para las secuencias de aminoácidos codificados dentro de SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC. Dependiendo de la secuencia particular, el grado de identidad de secuencia es preferiblemente mayor que 50% (por ejemplo 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% o más). Estos polipéptidos incluyen homólogos, ortólogos, variantes alélicas y mutantes. Típicamente, 50% de identidad o más entre dos secuencias de polipéptidos se considera que es una indicación de equivalencia funcional. La identidad entre los polipéptidos se determina preferiblemente por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se implementa en el programa MP-SRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de huecos afines con parámetros de penalización de hueco abierto=12 y por sanción de extensión de laguna=1.

[0022] Estos polipéptidos pueden, en comparación con las secuencias de los ejemplos, incluir uno o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir, reemplazos de un aminoácido con otro que tiene una cadena lateral relacionada. Aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos es decir, aspartato, glutamato; (2) básico, es decir lisina, arginina, histidina; (3) no polar es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de estas familias no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica. Además, los polipéptidos pueden tener una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) deleciones de un solo aminoácido con respecto a una secuencia de referencia. Además, los polipéptidos pueden incluir una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) inserciones (por ejemplo, cada uno de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) con respecto a una secuencia de referencia.

[0023] Los polipéptidos preferidos incluyen polipéptidos que son lipidados, que se encuentren en la membrana externa, que se encuentren en la membrana interna, o que se encuentren en el periplasma. Polipéptidos particularmente preferidos son los que pertenecen a más de una de estas categorías, por ejemplo, polipéptidos lipidados que se encuentran en la membrana externa. Las lipoproteínas pueden tener una cisteína *N*-terminal a la que los lípidos se unen covalentemente, a raíz de procesamiento posterior a la traducción del péptido de señal.
[0024] Un polipéptido preferido aparece en la Tabla 2.

[0025] La invención proporciona además polipéptidos que comprenden fragmentos de las secuencias de aminoácidos descritas en los ejemplos para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC. Del mismo modo, la invención proporciona polipéptidos que comprenden fragmentos de las secuencias de aminoácidos codificados dentro de SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC. Los fragmentos deben comprender aminoácidos *n* al menos consecutivos de las secuencias y, dependiendo de la secuencia particular, *n* es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más). El fragmento puede comprender al menos una de las células T o, preferiblemente, un epítopo de células B de la secuencia. Epítopos de células T y B se pueden identificar empíricamente (por ejemplo, utilizando PEPSCAN [14,15] o métodos similares), o pueden predecirse (por ejemplo, utilizando el índice antigénico de Jameson-Wolf [16], los enfoques basados en la matriz [17] TEPITOPE, [18], las redes neuronales [19], OptiMer & EpiMer [20,21], ADEPT [22], Tsites [23], hidrofilicidad [24], índice antigénico [25] o los métodos descritos en la referencia 26, etc.). Otros fragmentos preferidos son (a) los péptidos de señal N-terminal de los polipéptidos de la invención, (b) los polipéptidos, pero sin sus péptidos de señal N-terminales, (c) los polipéptidos, pero sin 1, 2, 3, 4 , 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de sus residuos de aminoácido N-terminal.

[0026] Otros fragmentos preferidos son los que comienzan con un aminoácido codificado por un potencial codón de inicio (ATG, GTG, TTG). Los fragmentos a partir de la metionina codificada por un codón de inicio corriente abajo del codón de inicio indicados son polipéptidos de la invención.

[0027] Otros fragmentos preferidos son los que son comunes a un polipéptido de la invención y a un polipéptido identificado en cualquiera de las referencias 5, 6, 8, 10 y 11.

[0028] Los polipéptidos de la invención se pueden preparar de muchas maneras, por ejemplo, por síntesis química (en todo o en parte), por digestión de polipéptidos más largos que utilizan proteasas, por la traducción de ARN, por purificación a partir de cultivo celular (por ejemplo, de expresión recombinante), a partir del propio organismo (por ejemplo, después de un cultivo bacteriano, o directamente de los pacientes), etc. Un método preferido para la producción de péptidos de <40 aminoácidos implicados en la síntesis química *in vitro* [27,28]. La síntesis de péptidos

en fase sólida se prefiere particularmente, tales como los métodos basados en química tBoc o Fmoc [29]. Síntesis enzimática [30] también puede ser usada en parte o en su totalidad. Como alternativa a la síntesis química, la síntesis biológica puede ser utilizada, por ejemplo, los polipéptidos pueden ser producidos por la traducción. Esto puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. Los métodos biológicos son, en general limitados a la producción de polipéptidos sobre la base de L-aminoácidos, pero la manipulación de la maquinaria de traducción (por ejemplo, de moléculas ARNt aminoacil) se pueden utilizar para permitir la introducción de D-aminoácidos (o de otros aminoácidos no naturales, como yodotirosina o metilfenilalanina, azidohomoalanine, etc.) [31]. Cuando se incluyen los D-aminoácidos, sin embargo, se prefiere utilizar la síntesis química. Los polipéptidos de la invención pueden tener modificaciones covalentes en el C-terminal y/o N-terminal.

[0029] Los polipéptidos de la invención pueden adoptar diversas formas (por ejemplo, nativa, fusiones, glicosilada, no glicosilada, lipidada, no lipidada, fosforilada, no fosforilada, miristoilada, no miristoilada, monomérica, multimérica, en partículas, desnaturalizada, etc .).

[0030] Los polipéptidos de la invención se proporcionan preferiblemente en forma purificada o sustancialmente purificada, es decir, sustancialmente libre de otros polipéptidos (por ejemplo, libre de polipéptidos de origen natural), particularmente de otros polipéptidos ExPEC o de célula huésped, y son generalmente al menos aproximadamente 50% puros (en peso), y por lo general al menos aproximadamente 90% puros, es decir menos de aproximadamente 50%, y más preferiblemente menos de aproximadamente 10% (por ejemplo 5% o menos) de una composición se compone de otros polipéptidos expresados. Los polipéptidos de la invención son polipéptidos preferiblemente ExPEC, y más preferiblemente MNEC.

[0031] Los polipéptidos de la invención pueden estar unidos a un soporte sólido. Los polipéptidos de la invención pueden comprender una etiqueta detectable (por ejemplo, un marcador radiactivo o fluorescente, o una etiqueta de biotina).

[0032] El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También incluidos dentro de la definición están, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ocurrir cadenas sencillas o cadenas asociadas. Los polipéptidos de la invención pueden ser glicosilados de forma natural o no natural (es decir, el polipéptido tiene un patrón de glicosilación que difiere del patrón de glicosilación encontrado en el correspondiente polipéptido de origen natural).

[0033] Los polipéptidos de la invención pueden ser de al menos 40 aminoácidos de longitud (por ejemplo, al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 , 300, 350, 400, 450, 500 o más). Los polipéptidos de la invención pueden ser más cortos de 500 aminoácidos (por ejemplo, no más de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos).

[0034] La invención puede usar polipéptidos que comprenden una secuencia -X-Y- o -Y-X-, en el que: -X- es una secuencia de aminoácidos como se define anteriormente y -Y- no es una secuencia como se define anteriormente es decir, proteínas de fusión. Cuando el codón N-terminal de una secuencia de codificación de polipéptido no es ATG, ese codón será traducido como aminoácido estándar para ese codón en lugar de como un Met, que se produce cuando el codón se traduce como un codón de inicio.

[0035] La invención también proporciona un polipéptido híbrido representado por la fórmula NH_2-A-[-XL-]$_N$-B-COOH, en el que X es un polipéptido de la invención como se ha definido anteriormente, L es una secuencia de enlazador opcional de ácido amino, A es una secuencia de aminoácidos opcional N-terminal, B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional, y *n* es un número entero mayor que 1, en el que el polipéptido híbrido es para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC. El valor de *n* es entre 2 y x, y el valor de x es típicamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. Preferiblemente, *n* es 2, 3 o 4; es más preferiblemente 2 o 3; más preferiblemente, *n*=2. Para cada instancia *n*, -X- pueden ser iguales o diferentes. Para cada instancia *n* de [-X-L-], la secuencia de aminoácidos de enlace -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando *n*=2 el híbrido puede ser NH_2-X_1-L_1-X_2-L_2-COOH, NH_2-X_1-X_2-COOH, NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH, NH_2-X_1-X_2-L_2-COOH, etc. Secuencia(s) de aminoácidos de enlazador -L- típicamente será corta (por ejemplo 20 o menos aminoácidos, es decir, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 , 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación, enlazadores de poli-glicina (es decir Gly_n donde *n*=2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), y etiquetas de histidina (es decir, His_n en la que *n*=3 , 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de ácido enlazador adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica. -A- y -B- son secuencias opcionales que normalmente serán cortas (por ejemplo, 40 o menos aminoácidos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26 , 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de polipéptidos, o secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, etiquetas de histidina es decir, His_n en la que *n*=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

o más). Otras secuencias de aminoácidos adecuadas N-terminal y C-terminal serán evidentes para los expertos en la técnica.

[0036] Varias pruebas se pueden utilizar para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, los polipéptidos pueden expresarse de manera recombinante y usarse para seleccionar el suero del paciente por inmunoblot. Una reacción positiva entre el polipéptido y el suero del paciente indica que el paciente ha montado previamente una respuesta inmune a la proteína en cuestión es decir, la proteína es un inmunógeno. Este método también se puede utilizar para identificar las proteínas inmunodominantes.

Composiciones farmacéuticas

[0037] La invención proporciona composiciones que comprenden: (a) polipéptido de la invención; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC. Estas composiciones pueden ser adecuadas como composiciones inmunogénicas, por ejemplo, o como reactivos de diagnóstico, o como vacunas. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas.

[0038] En un aspecto particular, la invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden una o más vesículas de membrana externa (OMV) expresan o sobreexpresan uno o más polipéptidos codificados por: (a) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs 511, 2453, 2455, 2677, 2691, 4595, 4747, 7003, 7051, 8167, 4627 y 5699; (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de (a); (c) una secuencia de nucleótidos que es un fragmento de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos de (a); o (d) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de (a) y que incluye un fragmento de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos de (a).

[0039] En otro aspecto, la invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden una o más vesículas de membrana externa (OMV) que expresan o sobreexpresan uno o más polipéptidos codificados por: (a) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nºs 8563, 2727 , 9871, 4671, 5679, 533, 3221, 3225 y 7003; (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de (a); (c) una secuencia de nucleótidos que es un fragmento de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos de (a); o (d) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 80% a una secuencia de nucleótidos de (a) y que incluye un fragmento de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos de (a).

[0040] Un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier portador que no induzca por sí mismo a la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los portadores adecuados son macromoléculas típicamente grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa, y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Tales portadores son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salínica, glicerol, etc. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, y similares, pueden estar presentes. Salina estéril libre de pirógenos, fisiológica tamponada con fosfato es un portador típico. Una discusión completa de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la ref. 234.

[0041] Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente si empaquetado en un formato de dosis múltiple.

[0042] Las composiciones de la invención pueden comprender detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), como Tween 80. Detergentes están generalmente presentes a niveles bajos, por ejemplo, <0,01%.

[0043] Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo cloruro sódico) para dar tonicidad. Una concentración de 10±2mg/ml NaCl es típica.

[0044] Las composiciones de la invención incluirán generalmente un tampón. Un tampón de fosfato es típico.

[0045] Las composiciones de la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo sacarosa o trehalosa), por ejemplo, en alrededor de 15-30mg/ml (por ejemplo 25 mg/ml), particularmente si han de liofilizarse o si incluyen material que se ha reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para la liofilización se puede ajustar a alrededor de 6,1 antes de la liofilización.

[0046] Los polipéptidos de la invención se pueden administrar en conjunción con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán generalmente un adyuvante de vacuna. El adyuvante puede seleccionarse de entre uno o más del grupo que consiste en un adyuvante TH1 y adyuvante TH2, se analiza más adelante. Los adyuvantes que pueden usarse en composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

A. Composiciones que contienen minerales

[0047] Composiciones que contienen minerales adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la ref. 53], o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso de fosfato), con los compuestos que toman cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y con la adsorción a la sal siendo preferida. Composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [54].

[0048] Las sales de aluminio pueden ser incluidas en las vacunas de la invención tal que la dosis de Al^{3+} es de entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

[0049] En otra realización, el adyuvante de la invención comprende tanto el fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización más particular del mismo, el adyuvante tiene una mayor cantidad de fosfato de aluminio de hidróxido de aluminio, tales como una relación de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o mayor que 9:1, en peso de fosfato de aluminio a hidróxido de aluminio. Más en particular aún, sales de aluminio en la vacuna están presentes en 0,4 a 1,0 mg por dosis de vacuna, o 0,4 a 0,8 mg por dosis de vacuna, o de 0,5 a 0,7 mg por dosis de vacuna, o alrededor de 0,6Mg por dosis de vacuna.

[0050] En general, el adyuvante preferido a base de aluminio, o la relación de múltiples adyuvantes basados en aluminio, tales como fosfato de aluminio a hidróxido de aluminio se selecciona por la optimización de la atracción electrostática entre las moléculas de tal modo que el antígeno lleva una carga opuesta como adyuvante al pH deseado. Por ejemplo, un adyuvante de fosfato de aluminio con pI ~ 4 adsorbe electrostáticamente lisozima, pero no de albúmina, a pH 7,4. En caso de que albúmina sea el objetivo, sería seleccionado adyuvante de hidróxido de aluminio (por ejemplo, con pH 11,4). Alternativamente, el tratamiento previo de hidróxido de aluminio con fosfato disminuye su pI, haciendo que sea un adyuvante preferido para los antígenos más básicos.

[0051] Un adyuvante de fosfato de aluminio típico es hidróxidofosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6Mg de Al^{3+}/ml. La adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio se puede utilizar, por ejemplo, entre 50 y 100 µg Al^{3+} por conjugado por dosis. Cuando un fosfato de aluminio se utiliza y no se desea para adsorber un antígeno al adyuvante, esto se favorece incluyendo iones de fosfato libres en solución (por ejemplo, mediante el uso de un tampón de fosfato).

B. Emulsiones de aceite

[0052] Composiciones de emulsión de aceite adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85, formuladas en partículas submicrométricas usando un fluidizador micro) [Capítulo 10 de la ref. 53; véase también las refs. 55-57 capítulo 12 de ref. 58.]. MF59 se utiliza como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente de virus de influenza FLUAD™. La emulsión comprende ventajosamente iones de citrato, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 10 mM.

[0053] Los adyuvantes particularmente preferidos para uso en las composiciones son emulsiones de aceite submicrónicas en agua. Emulsiones submicrométricas de aceite-en-agua preferidas para uso en esta invención son emulsiones de escualeno/agua, que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE, tales como una emulsión submicrométrica de aceite en agua que contiene escualeno de 4-5% en peso, 0,25-1,0% en peso de Tween 80 (monooleato de polioxieltilenosorbitan), y/o 0,25 a 1,0% de Span 85 (trioleato de sorbitán), y, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isogluatminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosfoforiloxi)-etilamina (MTP-PE). Emulsiones submicrónicas de aceite en agua, métodos de fabricación de los mismos y agentes inmunoestimulantes, tales como péptidos de muramil, para su uso en las composiciones, se describen en detalle en las referencias 55 y 59-60.

[0054] Una emulsión de escualeno, un tocoferol y Tween 80 se puede utilizar. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de tocoferol y de 0,3 a 3% de Tween 80, y la relación en peso de escualeno: tocoferol es preferentemente ≤1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. Una tal emulsión se puede hacer mediante la disolución de Tween 80 en PBS para dar una solución al 2%, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5g de DL-α-tocoferol y escualeno 5 ml), a continuación, microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm.

[0055] Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo Triton X-100) se puede utilizar.

[0056] Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121") se puede utilizar. La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un portador de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha utilizado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [61] (0,05 a 1% Thr-MDP, 5% escualeno, 2,5% de Pluronic $L_1$21 y 0,2% polisorbato 80). También se puede utilizar sin la Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [62] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere microfluidización.

[0057] El adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) también se pueden usar como adyuvantes en la invención.

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 53]

[0058] Las formulaciones de saponina también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol Molina *Quillaia saponaria* se han estudiado ampliamente como adyuvantes. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (sarsaprilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officianalis* (raíz de jabón). Formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM.

[0059] Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Fracciones purificadas específicas usando estas técnicas han sido identificadas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un método de producción de QS21 se describe en la ref. 63. Formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol [64].

[0060] Las combinaciones de saponinas y colesteroles pueden utilizarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de ref. 53]. ISCOM también incluyen típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede utilizarse en los ISCOM. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. ISCOM se describen adicionalmente en las referencias. 64-66. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional (s) [67].

[0061] Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se pueden encontrar en las referencias. 68 y 69.

D. Virosomas y partículas similares a virus

[0062] Los virosomas y partículas similares a virus (VLP) también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenos y no replicantes y generalmente no contienen genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse o aislarse de virus completos de forma recombinante. Estas proteínas virales adecuadas para el uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas de virus de influenza (tales como HA o NA), virus de hepatitis B (como proteínas del núcleo o de la cápsida), virus de hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, Rotavirus, Fiebre virus de fiebre aftosa, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, Qß-fago (por ejemplo, proteínas de cubierta), GA-fago, fr-fago, fago AP205, y Ty (como la proteína p1 Ty retrotransposón). VLP se analizan adicionalmente en las referencias. 70-75. Los virosomas se analizan más en, por ejemplo, ref. 76

E. Derivados bacterianos o microbianos

[0063] Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacterianos (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ADP ribosilatante y derivados desintoxicados de las mismas.

[0064] Derivados no tóxicos de LPS incluyen lípido monofosforil A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de lípido A monofosforil 3 de-O-acilado con cadenas aciladas 4, 5 ó 6. Una forma preferida de "partícula pequeña" de lípido A monofosforil 3 De-O-acilado se describe en la ref. 77. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para filtrarse de forma estéril a través de una membrana de 0,22 µm [77]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen lípido A monofosforil imita, tales como derivados de fosfato de glucosaminida de aminoalquil, por ejemplo RC-529 [78,79].

[0065] Derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe por ejemplo en las referencias 80 y 81.

[0066] Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para el uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótido que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina). ARN de doble cadena y oligonucleótidos que contienen

secuencias palindrómicas o poli(dG) también se han demostrado ser inmunoestimulantes.

[0067] Las CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla. Referencias 82, 83 y 84 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en las referencias. 85-90.

[0068] La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [91]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se discuten en las referencias. 92-94. Preferiblemente, el CpG es un ODN CpG-A.

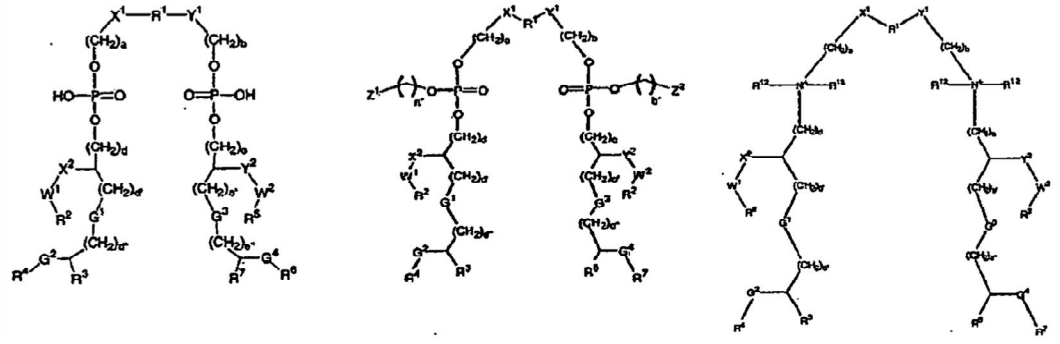
[0069] Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden estar unidos en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, refs. 91 y 95-97.

[0070] Otros oligonucleótidos inmunoestimuladores incluyen un ARN de doble cadena, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia de poli (dG).

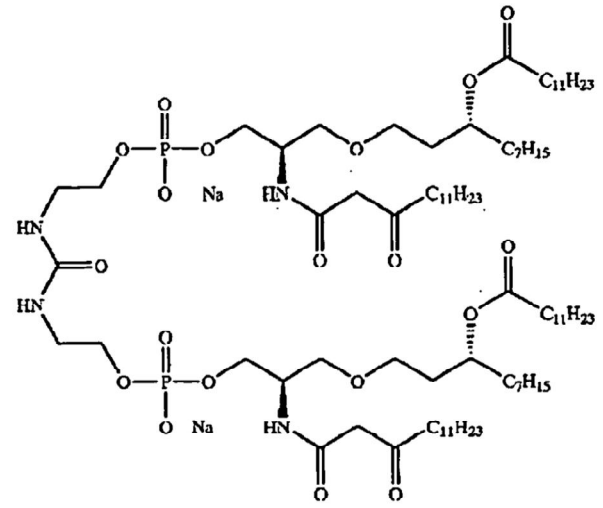
[0071] Toxinas de ribosilación de ADP bacterianas y derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina "LT" de calor lábil *E. coli*), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 98 y como adyuvantes parenterales en la ref. 99. La toxina o el toxoide está preferiblemente en la forma de una holotoxina, que comprende ambas subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación detoxificante; preferiblemente la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante de LT destoxificada tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas desintoxicadas derivadas de las mismas, particularmente ADP-ribosilación LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se pueden encontrar en las referencias 100-107. La referencia numérica para las instituciones de subaminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas de ribosilación de ADP establecidos en la ref. 108.

[0072] Los compuestos de fórmula I, II o III, o sus sales, también se pueden usar como adyuvantes:

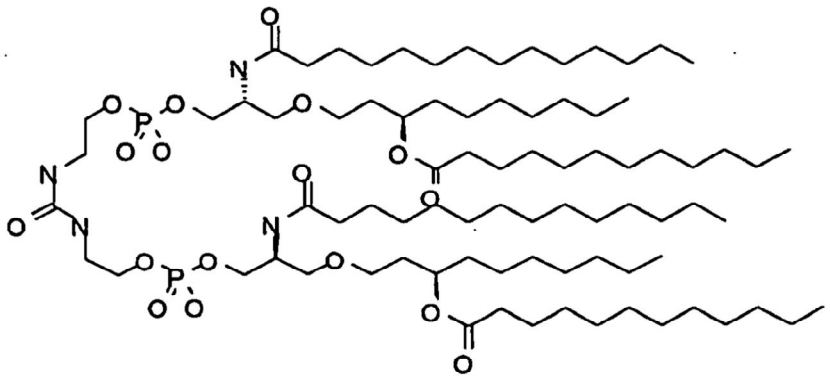
I II III



como se define en la referencia 109, tales como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', ER 804058 ',' ER 804059 ',' ER 804442 ',' ER 804680 ',' ER 804764 ', ER 803022 o 'ER 804057', por ejemplo:



ER804057



ER-803022:

F. Inmunomoduladores humanos

[0073] Inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [110], etc.) [111], interferones (por ejemplo interferón-γ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral y la proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa (MIP-1 alfa) y MIP-1 beta [112].

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

[0074] Los bioadhesivos y mucoadhesivos también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico [113] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli (ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa esterificados. Chitosan y derivados de los mismos también se pueden usar como adyuvantes en la invención [114].

H. Micropartículas

[0075] Las micropartículas también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (es decir, una partícula de ~100nm a ~150μm de diámetro, más preferiblemente a ~200nm ~30μm de diámetro, y lo más preferiblemente a ~500nm ~10μm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicas (por ejemplo, un poli(alfa-hidroxi ácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli (lactida-co-glicólido) son preferidas, tratadas opcionalmente para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (capítulos 13 y 14 de ref. 53)

[0076] Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para su uso como adyuvantes se describen en las referencias. 115-117.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y de éster de polioxietileno

[0077] Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [118]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietilen sorbitán en combinación con un octoxinol [119], así como éteres de alquilo de polioxietileno o tensioactivos de éster en combinación con al menos un agente tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [120]. Éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: éter de polioxietilen-9-lauril (laureth 9), éter de polioxietileno-9-steoril, éter de polioxiteileno-8-steoril, éter de polioxietilen-4-lauril, éter de polioxietilen-35-lauril, y éter de polioxietileno-23-laurilo.

K. Fosfacenos por ejemplo, PCPP

[0078] Adyuvantes de fosfaceno incluyen poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 121 y 122.

L. Péptidos de muramilo

[0079] Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-('-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina-MTP-PE).
Compuestos de imidazoquinolina M.
[0080] Adyuvantes de imidazoquinolina incluyen Imiquimod ("R-837") [123,124], Resiquimod ("R-848") [125], y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo las sales de hidrocloruro). Más detalles acerca de imidazoquinolinas inmunoestimulantes se pueden encontrar en las referencias 126 a 130.

N. Compuestos de tiosemicarbazona.

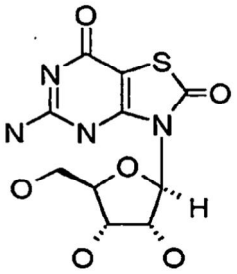
[0081] Los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como métodos de formulación, fabricación, y la detección de compuestos todos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la ref. 131. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF-α.

O. Compuestos de triptantrina

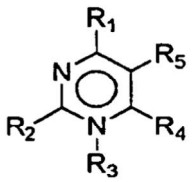
[0082] Ejemplos de compuestos de triptantrina, así como métodos de formulación, fabricación, y detección de compuestos todos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la ref. 132. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF-α.

P. Análogos de nucleósidos

[0083] Varios análogos de nucleósidos se pueden usar como adyuvantes, tales como (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



y profármacos de los mismos; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos descritos en las referencias 133 a 135; (f) un compuesto que tiene la fórmula:

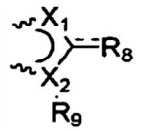


donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente H, halo, $-NR_aR_b$, -OH, alcoxi C_{1-6}, alcoxi C_{1-6} sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C_{6-10}, sustituido arilo C_{6-10}, alquilo C_{1-6}, o sustituido alquilo C_{1-6};

R_3 está ausente, H, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido, arilo C_{6-10}, C_{6-10} sustituido arilo, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;

R_4 y R_5 son cada uno independientemente H, halo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, $-C(O)-R_d$, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido, o unidos entre sí para formar un anillo de 5 miembros como en R_{4-5}:

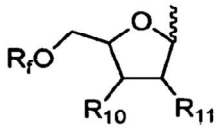


R_{4-5}

la vinculación alcanzándose en los enlaces indicados por una ~~~ X_1 y X_2 son cada uno independientemente N, C, O, o S;

R_8 es H, halo, -OH, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, -OH, $-NR_aR_b$, $-(CH_2)_n$-Rc, -O-(alquilo C_{1-6}), $-S(O)_pR_c$, o $-C(O)-R_d$;

R_9 es H, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R_{9a}, en el que R_{9a} es:



R_{9a}

la vinculación alcanzándose en el enlace indicado por una ~~~ R_{10} y R_{11} son cada uno independientemente H, halo, C_{1-6} alcoxi, alcoxi sustituido C_{1-6}, $-NR_aR_b$, o -OH;

cada R_a y R_b es independientemente H, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido, $-C(O)R_d$, arilo C_{6-10};

cada R_c es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C_{1-6}, o alquilo C_{1-6} sustituido;

cada R_d es independientemente H, halo, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido, alcoxi C_{1-6}, alcoxi C_{1-6} sustituido, $-NH_2$, -NH(C_{1-6} alquilo), -NH(alquilo C_{1-6} sustituido), $-N(\text{alquilo } C_{1-6})_2$, -N (alquilo sustituido $C_{1-6})_2$, arilo C_{6-10}, o heterociclilo; cada R_e es independientemente H, alquilo C_{1-6}, alquilo sustituido C_{1-6}, arilo C_{6-10}, arilo sustituido C_{6-10}, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;

cada R_f es independientemente H, alquilo C_{1-6}, alquilo sustituido C_{1-6}, $-C(O)R_d$, fosfato, difosfato, o trifosfato;

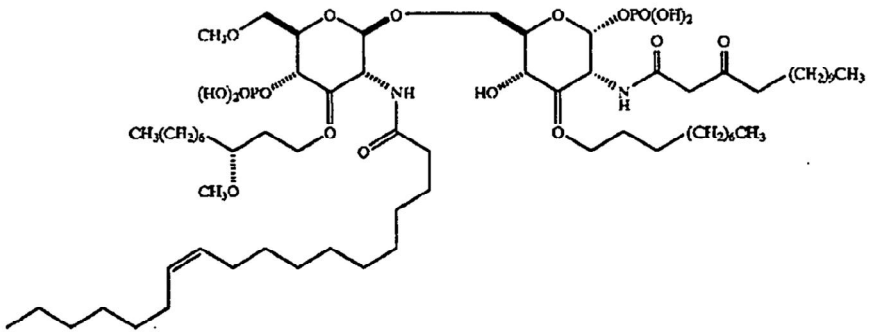
cada *n* es independientemente 0, 1, 2, o 3;

cada p es independientemente 0, 1, o 2; o

o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

Q. Los lípidos vinculados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato

[0084] Los adyuvantes que contienen lípidos vinculados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato que incluyen el antagonista de TLR4 E5564 [136,137]:



R. Inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIPs)

[0085] SMIPs incluyen:

- N2-metilo-1-(2-metilopropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2, N2-dimetilo-1-(2-metilopropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-etil-N2-metilo-1-(2-metilopropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metilo-1-(2-metilopropilo)-N2-propilo-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 1-(2-metilopropilo)-N2-propilo-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butilo-1-(2-metilopropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butilo-N2-metilo-1-(2-metilopropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metilo-1-(2-metilopropilo)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metilo-1-(2-metilopropilo)-N2-prop-2-enilo-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 1-(2-metilopropilo)-2 - [(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-4-amina;
- 1-(2-metilopropilo)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-4-amina;
- 2 - [[4-amino-1-(2-metilopropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2-il](metilo)amino]etanol;
- 2 - [[4-amino-1-(2-metilopropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2-il](metilo)amino]acetato de etilo;
- 4-amino-1-(2-metilopropilo)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolina-2-ona;
- N2-butilo-1-(2-metilopropilo)-N4, N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butilo-N2-metilo-1-(2-metilopropilo)-N4, N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metilo-1-(2-metilopropilo)-N4, N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2, N2-dimetilo-1-(2-metilopropilo)-N4, N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 1- {4-amino-2- [metilo (propilo)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-il}-2-metilo-2-ol;
- 1- [4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-il]-2-metilo-2-ol;
- N4, N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilopropilo)-N2-propilo-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina.

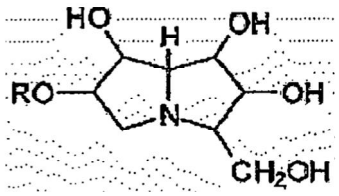
S. Proteosomas

[0086] Un adyuvante es una preparación de proteosoma de proteína de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de liposacáridos derivada de una segunda bacteria Gram negativa, en el que las preparaciones de proteosomas de proteínas de membrana y liposacáridos exteriores forman un estable no covalente complejo adyuvante. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo compuesto de membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos. Se han utilizado como adyuvantes para vacunas contra la influenza [138].

T. Otros adyuvantes

[0087] Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se describen en el capítulo 7 de la ref. 53. referencias 53 y 58. Otras sustancias adyuvantes útiles incluyen:

- Inosina 5'-monofosfato de metilo ("MIMP") [139].
- Un compuesto polihidroxlado de pirrolizidina [140], tal como uno que tiene la fórmula:



donde R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido, acilo insaturado, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenilo, alquinilo y arilo grupos, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de la misma. Ejemplos incluyen, pero no están limitado a: casuarina, casuarina-6-α-D-glucopiranosa, 3-epi-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-di*epi*-casuarina, etc.

• Una inulina gamma [141] o un derivado de la misma, tal como algamulina.

• Los compuestos descritos en la referencia 142.

• Los compuestos descritos en la referencia 143, incluyendo: compuestos acilpiperazina, compuestos de indolediona, compuestos de tetrahydraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de quinolinona de aminobencimidazol (ABIQ) [144,145], compuestos de hidraptalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de quinazilinona, compuestos de pirrol [146], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina, y compuestos de benzazol [147].

• Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [148].

• Una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (generalmente neutral), tales como aminopropil-dimetilo-miristoleiloxi- bromuro de propanaminio-difitanoilfosfatidilo-etanolamina ("Vaxfectin™") o aminopropil-dimetilo-bis-dodeciloxi-propanaminio bromuro-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren formulaciones que contienen (±)-N-(3-aminopropil)-N, N-dimetilo-2,3-bis(sin-9-tetradeceniloxi)-1- sales de propanaminio [149].

[0088] La invención también puede comprender combinaciones de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes combinaciones se pueden usar como composiciones adyuvantes en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite-en-agua [150]; (2) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) [151]; (3) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esterol) [152]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [153]; (6) SAF, que contiene 10% de escualano, 0,4% de Tween 80TM, 5% de polímero de bloque plurónico L121, y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitan con vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande. (7) Sistema de Ribi™ adyuvante (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de pared celular bacterianos del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (como 3dMPL); y (9) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulante (como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).

[0089] Las composiciones de la invención provocarán preferiblemente tanto una respuesta inmune mediada por células, así como una respuesta inmune humoral con el fin de tratar eficazmente una infección uropatógena. Esta respuesta inmune induce preferentemente (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) de larga duración y una inmunidad mediada por células que pueden responder rápidamente tras la exposición a antígenos asociados a MNEC.

[0090] Se cree que hay dos tipos de células T, las células CD4 y CD8, en general son necesarios para iniciar y/o mejorar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. Las células T CD8 pueden expresar un co-receptor CD8 y se conoce comúnmente como linfocitos T citotóxicos (CTL). Las células T CD8 son capaces de reconocer o interactuar con los antígenos que se muestran en las moléculas MHC de clase I. las células T CD4 pueden expresar un co-receptor CD4 y se denominan comúnmente como células T auxiliares. Las células T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a moléculas MHC de clase II. Tras la interacción con una molécula de MHC de clase II, las células CD4 pueden secretar factores tales como citoquinas. Estas citoquinas secretadas pueden activar las células B, células T citotóxicas, macrófagos y otras células que participan en una respuesta inmune. Las células T colaboradoras o células CD4 + se pueden dividir en dos subgrupos funcionalmente distintos: fenotipo TH1 y fenotipos TH2 que difieren en su función de las citocinas y el efector.

[0091] Las células TH1 activadas mejoran la inmunidad celular (incluyendo un aumento en la producción de CTL específica de antígeno) y por lo tanto son de especial valor en la respuesta a las infecciones intracelulares. Células TH1 activadas pueden secretar una o más de IL-2, IFN-γ, y TNF-β. Una respuesta inmune TH1 puede dar lugar a reacciones inflamatorias locales por los macrófagos de activación, células NK (células aniquilantes naturales), y células T citotóxicas CD8 (CTL). Una respuesta inmune TH1 también puede actuar para ampliar la respuesta inmune mediante la estimulación de crecimiento de células B y T con IL-12. Células B estimuladas por TH1 pueden secretar IgG2a.

[0092] Las células TH2 activadas mejoran la producción de anticuerpos y, por tanto, son de un valor particular en la respuesta a las infecciones extra-celulares. Las células TH2 activadas pueden secretar una o más de IL-4, IL-5, IL-6, y IL-10. Una respuesta inmune TH2 puede resultar en la producción de IgG1, IgE, IgA y células B de memoria para la protección futura.

[0093] Una respuesta inmune mejorada puede incluir una o más de una respuesta inmune TH1 mejorada y una respuesta inmune Th2. Una respuesta inmune TH1 mejorada puede incluir uno o más de un aumento en CTLs, un aumento en una o más de las citoquinas asociadas con una respuesta inmune TH1 (tales como IL-2, IFN-γ, y TNF-β), un aumento en los macrófagos activados, un aumento de la actividad NK, o un aumento en la producción de IgG2a. Preferiblemente, la respuesta inmune Th1 mejorada incluirá un aumento en la producción de IgG2a. Una respuesta inmune TH2 mejorada puede incluir uno o más de un aumento en una o más de las citoquinas asociadas con una respuesta inmunitaria Th2 (tal como IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10), o un aumento de la producción de IgG1, IgE y IgA y células B de memoria. Preferiblemente, la mayor respuesta inmune TH2 incluirá un aumento en la producción de IgG1.

[0094] Una respuesta inmune TH1 puede ser obtenida usando un adyuvante TH1. Un adyuvante TH1 generalmente provocará niveles incrementados de producción de IgG2a relativa a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes de TH1 adecuados para su uso en la invención pueden incluir, por ejemplo, formulaciones de saponina, virosomas y partículas similares a virus, derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), los oligonucleótidos inmunoestimulantes. Oligonucleótidos inmunoestimuladores, tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG, se prefieren adyuvantes TH1 para su uso en la invención.

[0095] Una respuesta inmune TH2 puede ser obtenida usando un adyuvante TH2. Un adyuvante TH2 generalmente provocará niveles incrementados de producción de IgG1 con respecto a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Adyuvantes TH2 adecuados para uso en la invención incluyen, por ejemplo, composiciones que contienen minerales, aceite de emulsiones, y toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados. Composiciones que contienen minerales, tales como sales de aluminio son adyuvantes de TH2 preferidos para uso en la invención.

[0096] Preferiblemente, la invención incluye una composición que comprende una combinación de un adyuvante TH1 y un adyuvante TH2. Preferiblemente, una composición de este tipo provoca una TH1 mejorada y una respuesta TH2 mejorada es decir, un aumento en la producción tanto de IgG1 y producción IgG2a con respecto a la inmunización sin un adyuvante. Aún más preferiblemente, la composición que comprende una combinación de un TH1 y un adyuvante TH2 provoca un aumento de TH1 y/o una respuesta inmune incrementada de TH2 en relación con la inmunización con un único adyuvante (es decir, con relación a la inmunización con un adyuvante TH1 solo o inmunización con un adyuvante TH2 solo).

[0097] La respuesta inmune puede ser una o ambas de una respuesta inmune Th1 y una respuesta TH2. Preferiblemente, la respuesta inmune proporciona una o ambas de una respuesta TH1 mejorada y una respuesta TH2 mejorada.

[0098] La respuesta inmune mejorada puede ser uno o ambos de una respuesta inmune sistémica y de mucosa. Preferiblemente, la respuesta inmune proporciona una o ambas de una respuesta inmune sistémica mejorada y una mucosa mejorada. Preferiblemente, la respuesta inmune de la mucosa es una respuesta inmune Th2. Preferiblemente, la respuesta inmune de la mucosa incluye un aumento en la producción de IgA.

[0099] El uso de un hidróxido de aluminio o adyuvante de fosfato de aluminio es particularmente preferido, y los antígenos son generalmente adsorbidos a estas sales. El fosfato de calcio es otro adyuvante preferido.

[0100] El pH de las composiciones de la invención es preferiblemente entre 6 y 8, preferiblemente aproximadamente 7. PH estable puede mantenerse mediante el uso de un tampón. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere utilizar un tampón de histidina **[**154]. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

[0101] Las composiciones se pueden presentar en viales, o pueden presentarse en jeringas previamente llenadas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una dosis única de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis única o dosis múltiples. Las composiciones inyectables normalmente serán soluciones o suspensiones líquidas. Alternativamente, pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo liofilizada) para solución o suspensión en portadores líquidos antes de la inyección.

[0102] Las composiciones de la invención pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiple. Para formas de dosis múltiples, los viales se prefieren jeringas previamente llenadas. Volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

[0103] Cuando una composición de la invención ha de prepararse extemporáneamente antes de su uso (por ejemplo, cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa previamente llenada y un vial, con el contenido de la jeringa que se utiliza para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

[0104] Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se quiere decir que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (primate por ejemplo, no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración del médico que trata de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina, y una cantidad típica de cada antígeno sacárido meningocócico por dosis es de entre 1 mg y 10 mg por antígeno.

Usos farmacéuticos

[0105] La invención se puede utilizar para tratar un paciente administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención. El paciente puede estar en riesgo de la enfermedad a sí mismos o puede ser una mujer embarazada ("inmunización materna '[155]).

[0106] La invención proporciona polipéptido de la invención para uso como medicamentos (por ejemplo, como composiciones inmunogénicas o como vacunas). También proporciona el uso de polipéptido de la invención en la fabricación de: (i) un medicamento para tratar o prevenir la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC; y/o (iii) un reactivo que puede generar anticuerpos contra una bacteria ExPEC. Dicha bacteria ExPEC puede ser de cualquier serotipo o cepa, pero son preferentemente bacterias MNEC, por ejemplo, serotipo K1 y/o tipo MLEE B2.

[0107] La invención es útil para la prevención y/o tratamiento de enfermedades tales como bacteremia, meningitis, una infección del tracto urinario, pielonefritis y/o cistitis. La invención es particularmente útil para el tratamiento de la sepsis y/o meningitis

[0108] El paciente es preferiblemente un ser humano. El ser humano puede ser un niño (por ejemplo, con edades comprendidas entre los 0 y 18 años, o entre 0-5 años), puede ser un adolescente (por ejemplo, edad 15-19), un adulto (por ejemplo, 19-54 años de edad) o pueden ser mayores (por ejemplo, 55 años o más). Los adolescentes y adultos son un grupo preferido de los pacientes. Una vacuna destinada a niños o adolescentes también se puede administrar a adultos por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

[0109] Otros posibles animales pacientes incluyen perros, que pueden ser portadores de ExPEC [156,157].

[0110] Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica seguimiento de la infección después de la administración de la composición de la invención. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitoreo de respuestas inmunes contra un polipéptido administrado después de la administración. La inmunogenicidad de composiciones de la invención se puede determinar mediante la administración a los sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12-16Meses de edad, o modelos animales, por ejemplo, un modelo murino) y después la determinación de los parámetros estándar, incluyendo títulos de ELISA (GMT) de IgG. Estas respuestas inmunitarias se determinarán generalmente alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararon con los valores determinados antes de la administración de la composición. Si se administra más de una dosis de la composición, más de una determinación posterior a la administración puede hacerse. La eficacia también puede evaluarse utilizando modelos de ratones adultos de sepsis, modelos de ratón de infección del tracto urinario, y de la protección pasiva de la meningitis en ratas jóvenes.

[0111] La administración de antígenos polipeptídicos es un método preferido de tratamiento para inducir la inmunidad.

[0112] Las composiciones de la invención generalmente se pueden administrar directamente a un paciente. La administración directa puede conseguirse por inyección parenteral (por ejemplo, administración subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o al espacio intersticial de un tejido), o por administración rectal, oral (por ejemplo, comprimido, aerosol), vaginal, tópica, transdérmica, transcutánea, intranasal, sublingual, ocular, auditiva,

mucosa pulmonar u otra. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o el brazo superior. La inyección puede realizarse mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero inyección sin aguja puede utilizarse alternativamente. Una dosis típica es de 0,5 ml por vía intramuscular.

[0113] La invención se puede usar para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa. Preferiblemente, el aumento de la inmunidad sistémica y/o mucosa se refleja en un aumento de TH1 y/o respuesta inmune Th2. Preferiblemente, la respuesta inmune mejorada incluye un aumento en la producción de IgG1 y/o IgG2a y/o IgA.

[0114] El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. Las dosis múltiples pueden utilizarse en un programa de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede ser seguido por un programa de dosis de refuerzo. En un programa de dosis múltiple las diversas dosis pueden administrarse por la misma o diferentes rutas por ejemplo un primer parenteral y mucosa impulso, un impulso primordial y parenteral mucosa, etc. tiempo adecuado entre las dosis de cebado (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre el cebado e impulsando, se puede determinar de forma rutinaria. Por ejemplo, un curso primario de vacunación puede incluir 1-10 dosis separadas, seguidas por otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores requeridos para mantener y/o reforzar una respuesta inmune, por ejemplo, en 1-4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una dosis o dosis posteriores después de varios meses.

[0115] Las infecciones bacterianas afectan a diversas áreas del cuerpo y por lo tanto composiciones pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, portadores líquidos antes de la inyección también se pueden preparar (por ejemplo, una composición de pulverización-secado por congelación o liofilizada). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como un ungüento, crema o polvo. La composición se prepara para administración oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula, como un aerosol, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o una pulverización. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como los sprays, gotas, gel o polvo [por ejemplo, referencias 158 y 159]. La composición puede estar en forma de kit, diseñado de tal manera que una composición combinada se reconstituye inmediatamente antes de la administración a un paciente. Tales kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados.

[0116] Las composiciones de la invención pueden ser administradas a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario) otras vacunas, por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo como una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna de pertussis, una vacuna DTP, una vacuna de tipo b. de *H. influenzae* conjugados, una vacuna del virus del papiloma humano, una vacuna contra el virus de la polio inactivada, una vacuna de virus de la hepatitis B, una vacuna neumocócica conjugada, una vacuna conjugada meningocócica, etc. Del mismo modo, se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario) un antibiótico, y en particular un compuesto antibiótico activo contra MNEC.

Otros componentes antigénicos de las composiciones de la invención

[0117] Una composición de la invención puede comprender un polipéptido de la invención y uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- Un antígeno de sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y (preferiblemente los cuatro), tal como el oligosacárido descrito en la ref. 160 del serogrupo C [véase también ref. 161] o los oligosacáridos de ref. 162.
- Un antígeno de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como los descritos en las refs. 163-171, etc.
- Un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 172, 173, 174].
- Un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, 175, 176].
- Un antígeno de virus de la hepatitis B, como los antígenos y/o núcleo de superficie [por ejemplo, 176, 177].
- Un antígeno de difteria, tal como un toxoide de la difteria [por ejemplo, el capítulo 3 de la ref. 178], por ejemplo, el mutante CRM_{197} [por ejemplo, 179].
- Un antígeno de virus de la hepatitis C [por ejemplo, 180].
- Un antígeno de VIH [181]

- Un antígeno del tétanos, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, el capítulo 4 de la ref. 178].

- Un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, refs. 182 y 183].

- Un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, 161].

- Antígeno(s) de la polio [por ejemplo, 184, 185] tal como IPV.

- Sarampión, las paperas y/o antígenos de rubéola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la ref. 178].

- Antígenos de varicela.

- Antígeno(s) de influenza [por ejemplo, capítulo 19 de la ref. 178], tales como la hemaglutinina y/o proteínas de la superficie de la neuraminidasa. Antígenos de la influenza se pueden derivar de cepas de la influenza interpandémicas (anuales). antígenos de la influenza se pueden derivar de cepas con el potencial de causar un brote pandémico (es decir, las cepas de influenza con nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en las cepas que circulan actualmente, o cepas de la influenza que son patógenos en sujetos de aves y tienen el potencial de ser transmitidos horizontalmente en las cepas de la población, o la influenza humana, que son patógenos para los seres humanos). Antígenos de la influenza se pueden derivar de los virus cultivados en huevos o cultivo celular.

- Un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 186].

- Un antígeno de sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B).

- Un antígeno proteico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 187, 188].

- Un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo, 189-192].

- Un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, refs. 193-199] o una combinación de antígenos de *C.pneumoniae* [p.ej. 200].

- Un antígeno de *Chlamydia trachomatis*, o una combinación de los antígenos de *C. trachomatis* [por ejemplo, 201].

- Un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 202].

- Antígeno(s) de la rabia [por ejemplo, 203], como el virus inactivado liofilizado [por ejemplo, 204, RabAvert™].

- Antígeno(s) de un paramixovirus tales como el virus sincitial respiratorio (RSV [205, 206]) y/o virus de parainfluenza (PIV3 [207]).

- Un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo, 208, 209, 210].

- Un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo, 188 211, 212].

- Un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 213].

- Un antígeno de un virus de la familia Flaviviridae (género flavivirus), tal como de virus de fiebre amarilla, de virus de la encefalitis japonesa, cuatro serotipos del virus del dengue, virus de la encefalitis por garrapatas, el virus del Nilo Occidental.

- Un antígeno de pestivirus, tal como de virus clásico de la fiebre porcina, virus de la diarrea viral bovina, y/o virus de enfermedad de la frontera.

- Un antígeno de parvovirus, por ejemplo, desde el parvovirus B19.

- Un virus del papiloma humano (HPV) antígeno [214]

[0118] La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales.

[0119] Los antígenos preferidos gonocócicas incluyen uno o más de ngs13 (OmpA), OmpH, ngs576 (cis peptidil-prolil/trans isomerasa (PPIasa) proteína), y ngs41 ngs117.

[0120] Los antígenos preferidos de HPV incluyen uno o más de HPV 16, HPV 18, HPV 6 y HPV 11.

[0121] Antígenos preferidos de *Chlamydia trachomatis* incluyen uno o más de: CT045, CT089, CT242, CT316, CT381. CT396, CT398, CT444, CT467, CT547, CT587, CT823, CT761 y combinaciones específicas de estos antígenos como se describe en el documento WO 05/002619.

[0122] Los antígenos preferidos *Chlamydia pneumoniae* incluyen uno o más de: CPn0324, Cpn0301, Cpn0482, Cpn0503, Cpn0525, Cpn0558, Cpn0584, Cpn0800, Cpn0979, Cpn0498, Cpn0300, Cpn0042, Cpn0013, Cpn450, Cpn0661, Cpn0557, Cpn0904, Clpn0795, Cpn0186 y Cpn0604 y combinaciones específicas de estos antígenos como se describe en el documento WO 05/084306.

[0123] Los antígenos preferidos GBS incluyen uno o más de GBS80, GBS 104, GBS 59, GBS 67, GBS 322 y GBS 276.

[0124] En otra realización, los antígenos de la invención se combinan con uno o más, antígenos no de *E. coli* adecuados para uso en una vacuna diseñada para proteger a las mujeres contra enfermedades genitourinarias y/o de transmisión sexual. Por ejemplo, los antígenos se pueden combinar con un antígeno derivado del grupo que consiste en *Streptococcus agalactiae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, papilomavirus y virus del herpes simple. Cuando se usan antígenos de papilomavirus humanos, pueden ser de uno o más de HPV 16, HPV 18, HPV 6 y/o HPV 11.

[0125] En otra realización, las combinaciones de antígenos de la invención se combinan con uno o más adicional, antígenos no ExPEC adecuados para su uso en una vacuna diseñada para proteger a las personas de edad avanzada o inmunocomprometidos. Por ejemplo, las combinaciones de antígeno se pueden combinar con un antígeno derivado del grupo que consiste de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Monocytogenes listeria*, *Meningitidies neisseria*, la influenza, y el virus de parainfluenza ('PIV').

[0126] Antígenos proteicos tóxicos pueden ser desintoxicados cuando sea necesario (por ejemplo detoxificación de toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos [183]).

[0127] Cuando un antígeno de difteria está incluido en la composición se prefiere incluir también el antígeno del tétanos y antígenos de pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos se prefiere incluir también antígenos de difteria y de pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de pertussis se prefiere también incluir antígenos de difteria y tétanos. Por lo tanto se prefieren combinaciones de DTP.

[0128] Antígenos de sacáridos están preferentemente en la forma de conjugados. Las proteínas portadoras para los conjugados incluyen toxinas bacterianas (tales como el toxoide diftérico o toxoide tetánico), la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [215], péptidos sintéticos [216,217], proteínas de choque térmico [218,219], proteínas de pertussis [220,221], proteína D de *H. influenzae* [222,223], citoquinas [224], [224] linfoquinas, proteínas *H.influenzae*, hormonas [224], factores de crecimiento [224], la toxina A o B de *C. difficile* [225], proteínas de captación de hierro [226], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de células T CD4 + humanos de diversos antígenos de patógenos derivados [227], tales como la proteína N19 [228], proteína de superficie neumocócica PspA [229], neumolisina [230], etc. Una proteína portadora preferida es proteína CRM197 [231].

[0129] Los antígenos en la composición típicamente estarán presentes a una concentración de al menos 1 mg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmune contra ese antígeno.

[0130] Los antígenos se adsorben preferiblemente en una sal de aluminio.

General

[0131] El término "que comprende" abarca "que incluye", así como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

[0132] El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

[0133] La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

[0134] Los residuos *N*-terminal en las secuencias de aminoácidos en la lista de secuencias se dan generalmente

como el aminoácido codificado por el primer codón en la secuencia de nucleótidos correspondiente. Cuando el primer codón no es ATG, se entenderá que se puede traducir como metionina cuando las funciones de codones como un codón de inicio, pero será traducido como el aminoácido indicado no-Met cuando la secuencia está en el C-terminal de una pareja de fusión. La invención da a conocer específicamente y abarca cada una de las secuencias de aminoácidos de la lista de secuencias que tiene un residuo de metionina N-terminal (por ejemplo, un residuo formil-metionina) en lugar de cualquier residuo indicado no-Met. También describe específicamente y abarca cada una de las secuencias de aminoácidos de la lista de secuencias a partir de los residuos de metionina en las secuencias internas.

[0135] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, las referencias 234-241, etc.

EXPERIMENTAL

[0136] A continuación se presentan ejemplos de formas de realización específicas o formas de llevar a cabo la presente invención. los ejemplos se ofrecen sólo a efectos ilustrativos.

[0137] Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero algunos errores y desviaciones experimentales deberían, por supuesto, permitirse.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

Cepa MNEC IHE3034

[0138] IHE3034 es una cepa de *E. coli* conocida del patotipo MNEC. La Tabla 1 de referencia 242 informa que IHE3034 se clasifica como serotipo O18:K1:H7/9, y cae en el grupo B2ECOR. Los genes asociados con virulencia conocida en elementos de ADN transferidos horizontalmente son *sfaII*, *ibeA, iro, kps* (grupo II), *fyuA* y *malX*. También lleva el grupo de genes de codificación cdt para la toxina de hinchamiento citoletal.

[0139] La secuenciación de cepa K1 de *E. coli* IHE3034 llevó a contigs 283. Estos se describen en el documento WO2006/089264 como SEQ ID NOs 9991-10273, dispuestas en orden de longitud descendente.

[0140] El análisis de la secuencia del genoma de la cepa K1 de *E. coli* IHE3034 ha identificado 4995 marcos de lectura abiertos (ORF), que se denominan por la nomenclatura *ORFnnnnn*, donde *nnnnn* es un número entre 00001 y 04995. Las secuencias de estas ORF se dan a conocer en WO2006/089264 como SEQ ID NOs: 1 a 9990, siendo SEQ ID NOs impares secuencias de ADN, e identificadores de número par que son secuencias de aminoácidos. La numeración *nnnnn* se puede convertir a SEQ ID NO: numeración de la lista de secuencias como sigue: para una secuencia de aminoácidos, SEQ ID NO: = *nnnnn* X 2; para una secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO: = [*nnnnn* 3 2] - 1. Así, en el documento WO2006/089264 *ORF01234* se encuentra como SEQ ID NOs: 2467 y 2468, como se muestra en la Tabla 1 de WO2006/089264.

[0141] Anotación funcional inicial de la 4995 ORFs se da en la Tabla 1 de WO2006/089264. Anotación funcional inicial de ORF00405 (SEQ ID NOs 809 y 810 WO2006/089264 y SEQ ID NOs 1 y 2 en el presente documento) se da en la Tabla 1 en el presente documento.

[0142] Sobre la base de diversos criterios aplicados por los inventores, un subconjunto de 142 de las 4995 ORFs (2,8%) ha sido seleccionado para su uso inmunogénico (Tabla 2 en WO2006/089264). ORF00405 aparece en la Tabla 2 en el presente documento. Los criterios para la selección del subconjunto incluyen, pero no se limitan a: baja homología con las ORF de cepas de *E. coli* comensales; longitud > 100aa; y la localización celular apropiada (que se muestra en la parte inferior de las tablas 2 y en el presente documento WO2006/089264).

[0143] Los genes que codifican estas 142 proteínas se clonan, expresadándose en bacterias (por ejemplo en un huesped de laboratorio no patógeno de *E. coli*, o en un *Bacillus* tales como *B. subtilis* o *B.megaterium*), purificado, y después se utilizan para inmunizar animales de ensayo (por ejemplo, ratones). El suero elevado en los ratones se analizó entonces en inmunoblot, ensayos ELISA y FACS, y se ensayan adicionalmente en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. Experimentos adecuados *in vitro* incluyen la prueba de la capacidad de los anticuerpos para inducir la muerte mediada por el complemento bacteriano y/o actividad de opsonofagocitosis, para bloquear la unión de las cepas MNEC (o el antígeno purificado) a células epiteliales humanas u otras células, líneas, y/o para inhibir adhesión/invasión de bacterias de *E. coli* (por ejemplo, cepa K1) a las células endoteliales microvasculares del cerebro (BMEC). Experimentos adecuados *in vivo* para probar la eficacia contra la bacteriemia y meningitis incluyen vacunas y desafío sistémicas activas y/o pasivas en ratas de 5 días de edad desafiadas con la cepa K1 de *E. coli*, y la inmunización y la infección intraperitoneal de ratones adultos con cepas MNEC.

[0144] La importancia de las proteínas en el ciclo de vida bacteriana se puede probar mediante la creación de mutantes knockout isogénicos. Los mutantes también se pueden utilizar para asegurar que los sueros planteados por un antígeno son específicos para ese antígeno. Microensayos se utilizan para estudiar los patrones de expresión. La conservación y/o la variabilidad se evalúa mediante la secuenciación de los genes de varias cepas diferentes ExPEC.

[0145] Los ensayos se realizaron con el fin de seleccionar las proteínas expuestas en la superficie predichas, que son específicas para las cepas MNEC y ausentes en las cepas no patógenas (cepas comensales y de laboratorio). Una vez seleccionadas estas proteínas se expresan y se purifican y se usan para inmunizar ratones.

[0146] Se conoce de referencia 43 que una mutación en cualquiera de los genes tol-pal de *E. coli* resulta en la formación de vesículas que contienen proteínas de la membrana externa nativas. Mediante la comparación de las proteínas presentes en las vesículas de cepas MNEC y cepas no patógenas, es posible seleccionar un pequeño grupo de proteínas que podrían utilizarse como antígenos potenciales.

Manipulación de genes mediada por Lambda-rojo en E. coli comensal y patógena

[0147] Este método es un método basado en PCR rápida utilizada para inactivar el gen tolR de las cepas de *E. coli* de de tipo silvestre [243]. Brevemente, la primera etapa consiste en la amplificación de forma independiente de regiones aguas arriba y aguas abajo del gen diana (tolR) y el casete marcador de resistencia. Los dos productos de PCR obtenidos en la etapa 1 se mezclan con el productor de la amplificación del casete de AB en concentraciones equimolares y se sometieron a una segunda ronda de PCR (PCR de tres vías) para generar un casete marcador de resistencia flanqueado por regiones 500 pb aguas arriba y aguas abajo (o más) homólogas al gen diana. En la tercera etapa, grandes cantidades (1µg) de la ADN lineal deseada son electroporadas en células competentes de Lamda-rojo.

Preparación de vesículas

1. Preparación de vesículas por precipitación con TCA

[0148] Los medios LB se inocularon con bacterias cultivadas en placas y se incubaron durante la noche a 37°C bajo agitación suave. El cultivo se utilizó para inocular 200 ml de LB a OD600 0,1. Las bacterias se cultivaron a OD600 0,4 (o como se indica). El cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 4000 x g y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 mm para eliminar las bacterias residuales.

[0149] También se realizaron los mismos experimentos en condiciones de limitación de hierro mediante la adición de dipiridilo (0,25 mM) a los medios LB.

[0150] La precipitación se realiza añadiendo cultivo sobrenadante de 10% final de una solución al 100% (en peso), TCA, 0,4% (en peso) de desoxicolato. La precipitación se dejó proceder durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se recuperó mediante 10 minutos de centrifugación a 20.000 x g a 4°C. El sedimento se lavó una vez con 10% TCA (en peso) y dos veces con etanol absoluto. El sedimento se secó con speed vac, y se almacenó a -20°C.

[0151] Las cepas de tipo silvestre y mutadas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS a partir del cual se pudo observar que había muchas más bandas en el sobrenadante de las cepas mutadas que en las cepas de tipo salvaje. Bandas aleatoriamente escogidas demostraron que todas las proteínas en el sobrenadante eran proteínas de membrana.

2. preparación de vesículas por ultracentrifugación

[0152] El sobrenadante del cultivo se ultracentrifugó a 200.000 x g durante 2 horas a 4°C. El sedimento se lavó con PBS, se resuspendieron en PBS, y se almacena a -20°C.

3. Desnaturalización de guanidinio de las vesículas

[0153] Antes de la desnaturalización de guanidinio, las vesículas se precipitaron con etanol. 10 µg de OMV en PBS se precipitaron mediante la adición de etanol absoluto frío a 90% final. La precipitación se dejó proceder durante 20 minutos a -20°C. El precipitado se recuperó mediante 10 minutos de centrifugación a 13.000 x g. El sedimento se resuspendió con 50 ml, de guanidinio 6M, 15 mM de DTT, 200 mM Tris-HCl, pH 8,0. La desnaturalización se dejó proceder durante 60 minutos a 60°C. Antes de la digestión, la solución se diluyó 1/8 con una solución de 1,5 M Tris pH 8.0 y 5 mg de tripsina se añadieron a la solución diluida. La digestión se dejó proceder durante la noche a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 0,1% final de ácido fórmico. Los péptidos se extrajeron usando cartuchos de extracción Oasis. Los péptidos fueron analizados por MS-MS acoplada a LC.

4. Digestión de la superficie

[0154] 5 mg de tripsina se añadieron a 10 mg de vesículas en PBS y se incubó a 37°C durante 3 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de 0,1% final de ácido fórmico. Los péptidos se recuperaron por filtración a través de un filtro de corte de 30 kDa y se extrajeron con cartucho de extracción Oasis. Los péptidos se analizaron por MS-MS acoplada a LC.

ANÁLISIS DE VESÍCULAS

La cuantificación de proteínas

[0155] Las proteínas se cuantificaron con el método de Bradford, utilizando BSA como estándar.

SDS-PAGE

[0156] Las muestras se analizaron con un dodecilsulfato de sodio (SDS) al 4-12% en gel de poliacrilamida, utilizando un aparato de electroforesis de Mini-Protean II. Las muestras se suspendieron en tampón de muestra SDS (0,06M Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) de glicerol, 2% (en peso) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol, 10 mg/ml de bromofenol azul) y se calentó a 100°C durante 5 min antes de electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida. Después de la aplicación, los geles se tiñeron con azul de Coomassie

[0157] Espectrometría de masas MALDI-TOF.

[0158] Las bandas de proteínas o manchas se escindieron de geles, se lavaron con 50 mM de bicarbonato de amonio/acetonitrilo (50/50, v/v), y se secaron con una centrífuga Speed-Vac (Savant). Las manchas secas se digirieron a 37°C durante 2 h mediante la adición de 7 a 10 ml de una solución que contiene bicarbonato de amonio 5 mM, 0,012 mg de tripsina de secuenciación de grado. Después de la digestión se cargaron 0,6 ml en una matriz objetivo pre-manchado y secado al aire. Las manchas se lavaron con 0,6Ml de una solución de etanol al 70%, ácido trifluoroacético al 0,1%. Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas MALDI TOF ultraflex. Los espectros se calibran externamente mediante el uso de una combinación de estándares pre-manchados en el objetivo. Identificación de proteínas se llevó a cabo por ambas comparaciones automáticas y manuales de picos monoisotópicos generados experimentalmente de péptidos en el intervalo de masa de 700 a 3.000 Da, con huellas generadas por ordenador, utilizando el programa de mascota.

Electroforesis bidimensional

[0159] 200 mg de vesículas se resuspendieron en una solución de re-hinchazón de inmobilina (urea 7M, tiourea 2M, 2% (en peso) de CHAPS (2% en peso) ASB14, 2% (v/v) de tampón IPG v pH 3 -10 NL, 2 mM de TBP, 65 mM de DTT), y adsorbido durante la noche en 7 cm de inmobilina DryStrips (pH 3-10 NL). Las proteínas fueron separadas por electroforesis 2D. La primera dimensión se realizó utilizando una Unidad de Isoelectroenfoque de IPGphor, aplicando secuencialmente 150 V durante 35 minutos, a 500 V durante 35 minutos, 1.000 V durante 30 minutos, 2.600 V durante 10 minutos, 3.500 V durante 15 minutos, 4.200 V durante 15 minutos, y, finalmente, 5000 V para llegar a 10kVh. Para la segunda dimensión, las tiras fueron equilibradas por dos incubaciones de 10 minutos en 4 M urea, 2 M tiourea, 30% de glicerol, 2% SDS, 5 mM TBP, Tris HCl 50 mM pH 8,8, 2,5% de acrilamida, azul de bromo fenol 0,2% : Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 4-12% prefabricados lineales.

[0160] Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal y escaneados con un densitómetro personal SI. Las imágenes se analizaron con el software de elite 2D de imagen principal.

Nano-LC/MS/MS

[0161] Los péptidos se separaron por nano-LC en un sistema de HPLC CapLC conectado a espectrómetro de masa Q-ToF Micro ESI - equipado con una fuente de nanopulverización. Las muestras se cargaron en una columna Atlantis C18 NanoEase (100 µm de diámetro interno x 100 mm), a través de una columna de trampa C18 (300 µm de diámetro interno x 5 mm). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 50 min desde 2% a 60% de 95% ACN, en una solución de ácido fórmico al 0,1% a una velocidad de flujo de 400 nl/minuto. Los péptidos eluidos se sometieron a un programa de adquisición automatizado que dependen de datos, utilizando el software MassLynx, versión 4.0, donde se utilizó una encuesta de exploración MS para seleccionar automáticamente péptidos multi-cargados sobre el rango de m/z de 400-2,000 para fragmentación de MS/MS. Hasta tres componentes diferentes se sometieron a fragmentación de MS/MS al mismo tiempo. Después de la adquisición de datos, el individuo espectros MS/MS se combinaron, se alisa y centroided por MassLynx. Búsqueda y identifica- ción de péptidos se realizaron en el modo por lotes con una versión con licencia de Mascot. Los parámetros de búsqueda MASCOT fueron: (1) las especies: ExPEC(2) permite un número de divisiones perdidas (sólo para la digestión de tripsina): 6; (3) modificaciones variables post-translacionales: la oxidación de metionina; (4) la tolerancia de péptidos: $\pm$500 ppm; (5) la tolerancia de MS/MS: $\pm$0,3 Da y (6): cargo péptido: +1 a +4. En cuanto a la plataforma anterior, sólo se consideraron importantes éxitos definidos por análisis de probabilidad MASCOTA. Los umbrales de puntuación para la aceptación de la identificación de proteínas a partir de al menos un péptido se establecieron por MASCOT como 18 para la digestión de tripsina y 36 de digestión de proteinasa K.

ANÁLISIS DE ANTÍGENOS

Modelo de ratón de infección sistémica

[0162] Para examinar un gran número de antígenos seleccionados por el análisis comparativo del genoma entre cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas, se ha establecido un modelo de protección basado en un ensayo de virulencia clásica.

[0163] El modelo experimental (inmunización e infección) utiliza ratones exógamos CD1 de 5 semanas de edad, los cuales son desafiados de la inoculación intraperitoneal de cepa virulenta de *E. coli* IHE3034. La dosis de desafío se ha determinado experimentalmente como la cantidad de bacterias capaces de matar 80% de los ratones adultos dentro de las 72 horas y corresponde a $1x10^7$ ufc/ratón para la cepa IHE3034 ..

[0164] Dos proteínas, que se describen como factores de virulencia y los antígenos protectores potenciales se utilizaron como controles positivos. Estas proteínas son las Ibea [244] y la IroN (refs 245.246). Las proteínas recombinantes se expresaron y se utilizaron en los ensayos de inmunización.

Protocolo de inmunización

[0165] Los ratones se inmunizaron tres veces por inyección subcutánea de 150 ml de solución de proteína usando adyuvantes de Freund como se muestra en la tabla siguiente:

	Ratones de control:	**Ratones inmunizados:**
Día 0	75 µl de solución salínica 75 µl de adyuvante de freund's completo	75 µl de solución proteínica **(20µg)** 75 µl de adyuvante de freund's completo
Día 21	75 µl de solución salínica 75 µl de adyuvante de freund's incompleto	75 µl de solución proteínica **(20µg)** 75 µl de adyuvante de freund's incompleto
Día 35	75 µl de solución salínica 75 µl de adyuvante de freund's incompleto	75 µl de solución proteínica **(20µg)** 75 µl de adyuvante de freund's incompleto

[0166] Las muestras de sangre se recogen el día antes de la primera inmunización (suero preinmune), en el día 34 y 48 (días antes de la exposición). Los sueros de los animales inmunizados se prueban por Inmunoblot y ELISA para determinar el título de anticuerpos.

Desafío

[0167] En el día 48, la cepa de *E. coli* IHE3034 se sembró sobre placa de agar LB de material congelado y se incubaron durante la noche (ON) a 37°C en una incubadora. En el día 49 la placa de cultivo ON se utilizó para inocular 50 ml de medio LB para tener una $O.D._{600}$ = 0,1, y se hicieron crecer durante 1,5 horas a 37°C con agitación hasta que el cultivo bacteriano alcance una $O.D._{600}$ = 0,6 correspondiente a $5x10^8$ ufc/ml para la cepa IHE3034. El cultivo se diluye en solución fisiológica hasta que la concentración de las bacterias es $1x10^8$/ml (típicamente 2 ml de cultivo bacteriano se diluye en 8 ml de solución fisiológica) y se sembraron utilizando un método de recuento en placa estándar para verificar el inóculo. 100 µl de la suspensión de células que contiene $1x10^7$ bacterias IHE3034 se inyecta por vía intraperitoneal, usando una jeringa de 1 ml, a ratones de control y los inmunizados. El número de muertes en cada grupo de animales a 24, 48 y 72 horas después de la infección se registran.

[0168] La protección debido a la vacunación se evalúa por comparación de la supervivencia en el grupo vacunado y la supervivencia en el grupo de control de ratones a las 72 horas desde el desafío. El porcentaje de supervivencia en relación con los controles se calcula utilizando la fórmula:

$$\frac{\text{Tasa de superviviencia en grupo de vacuna - Tasa de supervivencia en el grupo de control}}{\text{Tasa de supervivencia en el grupo de control}}$$

Resultados

[0169] La inmunización se llevó a cabo como anteriormente con controles positivos IroN y IbeA. Como puede verse en las Figuras 3 y 4, el % de supervivencia de los ratones después del desafío con IHE3034 se incrementa después

de la inmunización ya sea con IroN o con IbeA.

[0170] La inmunización se llevó a cabo a continuación con IHE3034 inactivada por calor. Como puede verse en la Figura 1, el % de supervivencia de los ratones después del desafío con IHE3034 se incrementa después de la inmunización con IHE3034 inactivada por calor.

[0171] La inmunización también se llevó a cabo con vesículas de IHE3034 ΔTol-R. Como puede verse en la Figura 2, el % de supervivencia de los ratones después del desafío con IHE3034 se incrementa después de la inmunización con IHE3034 ΔTol-R.

Estudios de inmunización

[0172] Los antígenos son seleccionados para combinarse para dar una composición de la invención. Ratones BALB/c se dividieron en nueve grupos y se inmunizaron de la siguiente manera:

Grupo	Composición de inmunización	Medio de administración
1	Mezcla de antígenos (10-20 µg proteína/cada) + CFA (adyuvante de Freund completo)	Intra-peritoneal o intra-nasal o subcutánea
2	Mezcla de antígenos (5 µg/cada) +Al-hidróxido (200µg)	Intra-peritoneal o intra-nasal o subcutánea
3	Mezcla de antígenos (10-20µg proteína/cada) +CpG (10ug)	Intra-peritoneal o intra-nasal o subcutánea
4	Mezcla de antígenos (10-20µg proteína/cada) + Al- hidróxido (200µg) + CpG (10µg)	Intra-peritoneal o intra-nasal o subcutánea
5	CFA	Intra-peritoneal o intra-nasal o subcutánea
6	Mezcla de antígenos (10-20µg proteína/cada) + LTK63 (5µg)	Intra-peritoneal o intra-nasal o subcutánea
7	Al-hidróxido (200µg) + CpG (10µg)	Intra-peritoneal o intra-nasal o subcutánea
8	CpG (10µg)	Intra-peritoneal o intra-nasal o subcutánea
9	LTK63 (5µg)	Intra-peritoneal o intra-nasal o subcutánea

[0173] Los ratones son inmunizados en intervalos de dos semanas. De dos a tres semanas después de la última inmunización, todos los ratones son desafiados con la cepa MNEC apropiada. Cuando se utiliza la inmunización de la mucosa (por ejemplo, intranasal), el modelo animal también se desafió por vía mucosa para poner a prueba el efecto protector de la mucosa inmunógeno. Inmediatamente antes de la exposición, los ratones se sangraron para determinar el título de anticuerpos contra los antígenos que se administraron.

[0174] Para el desafío del ratón, bacterias virulentas se cultivan en medios apropiados. Las bacterias se cosechan por centrifugación, se resuspendieron, y se diluyeron en serie para el inóculo de desafío. Ratones BALB/c son desafiados y observados diariamente durante 30 días después de la exposición.

[0175] Subtipos IgG e IgG1/IgG2a totales se pueden medir en los sueros de ratón como resultado de los diferentes regímenes de inmunización mediante el uso de un ensayo ELISA en bacterias enteras y en proteínas recombinantes purificadas. Además, evaluación de CD4+ y CD8+TH específicas a antígeno en células de bazo y/o PBMC aisladas de ratones inmunizados se pueden llevar a cabo mediante análisis FACS de parámetros múltiples, para evaluar los perfiles de expresión de citoquinas de las células T específicas de antígeno. En particular la producción de IFN-γ e IL-5 se puede medir después de la estimulación *in vitro* de células T con antígenos purificados. Además, los esplenocitos y/o PBMC procedentes de ratones inmunizados con cada formulación de antígeno/vacuna pueden ser requeridos 10-12 días después de la última dosis de inmunización y se estimularon con bacterias MNEC. Después de 4 horas de estimulación, se añade Brefeldina A a las células durante las siguientes 12 horas, para bloquear la secreción de citoquinas. Posteriormente las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos para detectar células T específicas a MNEC que expresan IFN-γ y IL-5.

[0176] Las células T pueden ser aisladas de linfocitos de sangre periféricos (PBLs) por una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las poblaciones de células T pueden ser "enriquecidas" de una población de PBL mediante la eliminación de las células accesorias y B. En particular, el

enriquecimiento de células T se puede lograr mediante la eliminación de las células no T usando anticuerpos monoclonales anti-MHC de clase II. Del mismo modo, otros anticuerpos pueden ser usados para agotar poblaciones específicas de células no T. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpo anti-Ig se pueden usar para agotar las células B y las moléculas de anticuerpo anti-MacI se pueden utilizar para agotar los macrófagos.

[0177] Las células T se pueden fraccionar aún más en un número de diferentes subpoblaciones mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Dos subpoblaciones principales pueden ser aisladas en base a su expresión diferencial de marcadores de superficie celular CD4 y CD8. Por ejemplo, tras el enriquecimiento de las células T como se ha descrito anteriormente, las células CD4+ se pueden enriquecer utilizando anticuerpos específicos para CD4. Los anticuerpos se pueden acoplar a un soporte sólido tal como perlas magnéticas. Por el contrario, las células CD8+ se pueden enriquecer mediante el uso de anticuerpos específicos para CD4 (para eliminar las células CD4+), o puede aisladarse mediante el uso de anticuerpos CD8 acoplados a un soporte sólido. Linfocitos CD4 de los pacientes infectados por MNEC se pueden expandir ex vivo, antes o después de la transducción.

[0178] Después de la purificación de las células T, las células T purificadas se pre-estimulan con diversas citoquinas incluyendo, pero no limitándose a rIL-2, IL-10, IL-12 e IL-15, que promueven el crecimiento y la activación de los linfocitos.

[0179] Las células T específicas a MNEC, pueden ser activadas por los polipéptidos inmunogénicos descritos anteriormente. Las células T específicas a MNEC pueden ser CD8+ o CD4+. Las células T CD8+ específicas a MNEC pueden ser linfocitos T citotóxicos (CTL), los cuales pueden matar las células infectadas MNEC que muestran cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o fragmentos de los mismos complejos con una molécula MHC de clase I. Las células T CD8+ específicas a Chlamydia se pueden detectar mediante, por ejemplo, ensayos de liberación de ^{51}Cr. Ensayos de liberación de ^{51}Cr miden la capacidad de células T CD8+ específicas MNEC para lisar las células diana que presentan uno o más de estos epítopos. Las células T CD8+ específicas a MNEC que expresan agentes antivirales, tales como IFN γ, también se contemplan en este documento y también se pueden detectar por métodos inmunológicos, preferentemente por tinción intracelular para IFN-γ o citoquinas iguales después de la estimulación *in vitro* con uno o más de los polipéptidos MNE anteriormente descritos. Las células T CD4+ específicas MNEC pueden ser detectadas por un ensayo de proliferación linfocitaria. Ensayos de linfoproliferación miden la capacidad de las células T CD4+ específicas MNEC para proliferarse en respuesta a uno o más de los polipéptidos descritos anteriormente.

TABLA 1 - Anotación de ORF00405

ORFnnnnn	**SEQ ID NOs**	**Anotación**
ORF00405	1&2	Adhesina putativa

TABLA 2 - Antígeno preferido

ORF00405

Ubicación de membrana interna: *ORF00405*

REFERENCIAS (cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia)

[0180]

[1] Russo & Johnson (2000) J Infect Dis 181:1753-1754.
[2] Uehling et al. (1997) J Urol 157:2049-2052.
[3] Tammen (1990) Br J Urol 65:6-9.
[4] Langermann et al. (1997) Science 276:607-611.
[5] WO03/074553.
[6] WO01/66572.
[7] Janke et al. (2001) FEMS Microbiol Lett 199:61-66.
[8] WO2004/005535.
[9] Dobrindt et al. (2002) Infect Immun 70:6365-6372.
[10] US2003/0165870.
[11] Welch et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:17020-17024.
[12] American Type Culture Collection: ATCC 700928.
[13] European Journal of Biochemistry 2003; 1 Suplemento 1 julio: abstracto P1.3-11.
[14] Geysen et al. (1984) PNAS USA 81:3998-4002.

[15] Carter (1994) Methods Mol Biol 36:207-223.
[16] Jameson, BA et al. 1988, CABIOS 4(1):181-186.
[17] Raddrizzani & Hammer (2000) Brief Bioinform 1(2):179-189.
[18] De Lalla et al. (1999) J. Immunol. 163:1725-1729.
[19] Brusic et al. (1998) Bioinformatics 14(2):121-130
[20] Meister et al. (1995) Vaccine 13(6):581-591.
[21] Roberts et al. (1996) AIDS Res Hum Retroviruses 12(7):593-610.
[22] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) Comput Appl Biosci 9(3):291-297.
[23] Feller & de la Cruz (1991) Nature 349(6311):720-1.
[24] Hopp (1993) Peptide Research 6:183-190.
[25] Welling et al. (1985) FEBS Lett. 188:215-218.
[26] Davenport et al. (1995) Immunogenetics 42:392-297.
[27] Bodanszky (1993) Principles of Peptide Synthesis (ISBN: 0387564314).
[28] Fields et al. (1997) Meth Enzymol 289: Solid-Phase Peptide Synthesis. ISBN: 0121821900.
[29] Chan & White (2000) Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. ISBN: 0199637245.
[30] Kullmann (1987) Enzymatic Peptide Synthesis. ISBN: 0849368413.
[31] Ibba (1996) Biotechnol Genet Eng Rev 13:197-216.
[32] Breedveld (2000) Lancet 355(9205):735-740.
[33] Gorman & Clark (1990) Semin. Immunol. 2:457-466.
[34] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
[35] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols).
[36] Patente de EE.UU. 5,707,829
[37] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al. eds., 1987) Suplemento 30.
[38] EP-B-0509612.
[39] EP-B-0505012.
[40] Johnson & Stell (2001) J Clin Microbiol 39:3712-33717.
[41] Tang et al. (1997) Clin. Chem. 43:2021-2038.
[42] PCT/IB2005/003494.
[43] Bernadac et al. (1998) J Bacteriol 180(18):4872-4878.
[44] EP-1441036.
[45] Sorensen & Mortensen (2005) Journal of Biotechnology 115:113-128.
[46] Meynial-Salles et al. (2005) Applied and Environmental Microbiology 71:2140-2144.
[47] US2004/0209370.
[48] WO00/68253.
[49] WO97/04110.
[50] Alper et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:12678-12683.
[51] WO 01/09350.
[52] Patente Europea 0624376.
[53] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
[54] WO00/23105.
[55] WO90/14837.
[56] Podda (2001) Vaccine 19:2673-2680.
[57] Frey et al. (2003) Vaccine 21:4234-4237.
[58] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de la serie Methods in Molecular Medicine). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
[59] Patente de EE.UU. 6,299,884.
[60] Patente de EE.UU. 6,451,325.
[61] Allison & Byars (1992)Res Immunol 143:519-525.
[62] Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486-3489.
[63] Patente de EE.UU. 5,057,540.
[64] WO96/33739.
[65] EP-A-0109942.
[66] WO96/11711.
[67] WO00/07621.
[68] Barr et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
[69] Sjolanderet et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
[70] Niikura et al. (2002) Virology 293:273-280.
[71] Lenz et al. (2001) J Immunol 166:5346-5355.
[72] Pinto et al. (2003) J Infect Dis 188:327-338.
[73] Gerber et al. (2001) Virol 75:4752-4760.
[74] WO03/024480
[75] WO03/024481
[76] Gluck et al. (2002) Vaccine 20:B10-B16.
[77] EP-A-0689454.
[78] Johnson et al. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.

[79] Evans et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.
[80] Meraldi et al. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
[81] Pajak et al. (2003) Vaccine 21:836-842.
[82] Kandimalla et al. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.
[83] WO02/26757.
[84] WO99/62923.
[85] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
[86] McCluskie et al. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.
[87] WO98/40100.
[88] Patente de EE.UU. 6,207,646.
[89] Patente de EE.UU. 6,239,116.
[90] Patente de EE.UU. 6,429,199.
[91] Kandimalla et al. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.
[92] Blackwell et al. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
[93] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
[94] WO01/95935.
[95] Kandimalla et al. (2003) BBRC 306:948-953.
[96] Bhagat et al. (2003) BBRC 300:853-861.
[97] WO03/035836.
[98] WO95/17211.
[99] WO98/42375.
[100] Beignon et al. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.
[101] Pizza et al. (2001) Vaccine 19:2534-2541.
[102] Pizza et al. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
[103] Scharton-Kersten et al. (2000) Infect Immun 68:5306-5313.
[104] Ryan et al. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
[105] Partidos et al. (1999) Immunol Lett 67:209-216.
[106] Peppoloni et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-293.
[107] Pine et al. (2002) J Control Release 85:263-270.
[108] Domenighini et al. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.
[109] WO03/011223.
[110] WO99/40936.
[111] WO99/44636.
[112] Lillard JW et al., (2003) Blood 101(3):807-14. Epub 2002 Sep 12.
[113] Singh et al] (2001) J Cont Release 70:267-276.
[114] WO99/27960.
[115] Patente de EE.UU. 6,090,406
[116] Patente de EE.UU. 5,916,588
[117] EP-A-0626169.
[118] WO99/52549.
[119] WO01/21207.
[120] WO01/21152.
[121] Andrianov et al. (1998) Biomaterials 19:109-115.
[122] Payne et al. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.
[123] EE.UU. 4,680,338.
[124] EE.UU. 4,988,815.
[125] WO92/15582.
[126] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
[127] Wu et al. (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83.
[128] Vasilakos et al. (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74.
[129] Patentes de EE.UU. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 and 6924293.
[130] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
[131] WO04/60308
[132] WO04/64759.
[133] EE.UU. 6,924,271.
[134] EE.UU. 2005/0070556.
[135] EE.UU. 5,658,731.
[136] Wong et al. (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-742.
[137] EE.UU. 2005/0215517.
[138] WO02/072012.
[139] Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-1186.
[140] WO2004/064715.
[141] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-580.

[142] PCT/US2005/022769.
[143] WO2004/87153.
[144] EE.UU. 6,605,617.
[145] WO02/18383.
[146] WO2004/018455.
[147] WO03/082272.
[148] Patente de EE.UU. 5,011,828.
[149] EE.UU.-6586409.
[150] WO99/11241.
[151] WO94/00153.
[152] WO98/57659.
[153] Solicitudes de Patente Europea 0835318, 0735898 and 0761231.
[154] WO03/009869.
[155] Glezen & Alpers (1999) Clin. Infect. Dis. 28:219-224.
[156] Johnson et al (2001) Infect Immun 69:1306-1314.
[157] Johnson et al. (2001) J Infect Dis 183:897-906 (véase también 183:1546).
[158] Almeida & Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.
[159] Agarwal & Mishra (1999) Indian J Exp Biol 37:6-16.
[160] Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-698.
[161] Costantino et al. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
[162] Solicitud de Patente Internacional WO03/007985.
[163] WO 99/24578.
[164] WO 99/36544.
[165] WO 99/57280.
[166] WO 00/66791.
[167] WO 01/64922.
[168] WO 01/64920.
[169] WO 03/020756.
[170] WO 2004/032958.
[171] WO 2004/048404.
[172] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
[173] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v.
[174] Jedrzejas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
[175] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
[176] Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
[177] Gerlich et al. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-S68 & S79-S80.
[178] Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
[179] Del Guidice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
[180] Hsu et al. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915.
[181] Stratov et al. (2004) Curr Drug Tgts 5(1):71-88.
[182] Gustafsson et al. (1996) *N*. Engl. J. Med. 334:349-355.
[183] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238.
[184] Sutter et al. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
[185] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.
[186] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-S107.
[187] Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-56.
[188] Solicitud de Patente Internacional WO02/34771.
[189] WO 99/24578.
[190] WO 99/36544.
[191] WO 99/57280.
[192] WO 02/079243.
[193] WO 02/02606.
[194] Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
[195] Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
[196] Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3):S524-S527.
[197] WO 99/27105.
[198] WO 00/27994.
[199] WO 00/37494.
[200] WO2005/084306.
[201] WO2005/002619.
[202] Ross et al. (2001) Vaccine 19:4135-4142.
[203] Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl:S2-S6.
[204] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
[205] Anderson (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S59-S65.
[206] Kahn (2000) Curr Opin Pediatr 12:257-262.
[207] Crowe (1995) Vaccine 13:415-421.

[208] Modlin et al. (2001) J Toxicol Clin Toxicol 39:85-100.
[209] Demicheli et al. (1998) Vaccine 16:880-884.
[210] Stepanov et al. (1996) J Biotechnol 44:155-160.
[211] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-243, viii.
[212] Ferretti et al. (2001) PNAS USA 98: 4658-4663.
[213] Kuroda et al. (2001) Lancet 357(9264):1225-1240; véase también páginas 1218-1219.
[214] WO 00/09699.
[215] EP-A-0372501
[216] EP-A-0378881
[217] EP-A-0427347
[218] WO93/17712
[219] WO94/03208
[220] WO98/58668
[221] EP-A-0471177
[222] EP-A-0594610.
[223] WO00/56360
[224] WO91/01146
[225] WO00/61761
[226] WO01/72337
[227] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
[228] Baraldo et al, (2004) Infect Immun. 72:4884-4887
[229] WO02/091998.
[230] Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-2713.
[231] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
[232] Needleman& Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453.
[233] Rice et al. (2000) Trends Genet 16:276-277.
[234] Gennaro (2000)Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
[235] Methods In Enzymology (S. Colowick and *N*. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
[236] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications)
[237] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
[238] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
[239] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).
[240] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press)
[241] PCR (introduction to Biotechniques Series), 2ª edición (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
[242] Dobrindt et al. (2003) J Bacteriol 185:1831-1840.
[243] Murphy (1998) J. Bacteriol 180:2063-2071.
[244] Huang et al. (2001) J Infect Dis 183:1071-1078.
[245] Russo et al. (2002) Infect Immun 70:7156-7160.
[246] Russo et al. (2002) Infect Immun 71:7164-7169.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0181]

<110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC., J. CRAIG VENTER INSTITUTE, INC. & BERLANDA SCORZA, FRANCESCO

<120> PROTEÍNAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS DE LA MENINGITIS/ ESCHERICHIA COLI ASOCIADA A SEPSIS

<130> P056231EP

<150> US 60/654.632
<151> 2005-02-18

<150> US 60/712.720
<151> 2005-08-29

<160> 2

<170> SeqWin99, versión 1,0,4

<210> 1
<211> 4251
<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 1

```
atgtcacgtt ataaaacaga caataaacag ccacgatttc gttattcagt tctggcccgc    60
tgcgtggcgt gggcaaatat ctctgttcag gttctttttc cactcgctgt caccttacg    120
ccagtaatgg cagcacgtgc gcagcatgcg gttcagccac ggttgagcat ggaaaatact    180
acggtaactg ctgataataa cgtggagaaa aatgtcgcgt cgcttgccgc taatgccggg    240
acatttttaa gcagtcagcc agatagcgat gcgacacgta actttattac cggaatggcc    300
accgctaaag ctaaccagga aattcaggag tggctcggga aatacggtac tgcgcgcgtc    360
aaactgaatg tcgataaaaa tttctcgctg aaggactctt cgctggaaat gctttatccg    420
atttatgata caccgacaaa tatgttgttc actcaggggg caatacatcg taccgacgat    480
cgtactcagt caaatattgg ttttggctgg cgtcattttt cagaaaatga ctggatggcg    540
ggggtgaata cttttatcga tcatgattta tcccgtagtc atacccgcat tggtgttggt    600
gcggaatact ggcgtgatta tttgaaactg agcgccaatg gttatatccg ggcttctggc    660
tggaaaaaat cgccggatgt tgaggattat caggaacgcc cggcgaatgg ctgggatatt    720
cgtgctgagg gctatttacc tgcctggccg cagcttggcg caagcctgat gtatgaacag    780
tattatggcg atgaagtcgg gctgtttggt aaagataaac gccagaaaga tccacatgcg    840
attaccgctg aagtgaatta cacgccagtg cctcttctga ccctgagtgc cgggcataag    900
cagggcaaga gtggtgagaa tgacactcgc tttggcctgg aagttaatta tcggattggc    960
gaacctctgg aaaaacaact cgatacagac agcattcgcg agcgtcgaat gctggcaggc   1020
agccgctatg acctggttga gcgtaataac aatatcgttc ttgagtatcg caaatctgaa   1080
gtgatccgta ttgctctgcc tgagcgtatt gaaggcaagg gcggccagac ggtttccctg   1140
gggcttgtgg tcagcaaagc aactcacggt ctgaaaaatg tgcaatggga agcgccgtct   1200
ttgctggccg caggcggaaa aattacgggg cagggcaatc agtggcaagt gacgctcccg   1260
gcttatcagg caggcaaaga caattattat gcgatttcag cgattgccta cgataacaaa   1320
ggcaatgcct cgaaacgtgt gcagacagaa gtagttatta gcggagctgg tatgagcgcc   1380
gatcgtacgg cgttaacgct tgacggtcag agccgtattc aaatgcttgc taacggtaat   1440
gagcaaaagc cgctggtgct gtctctgcgc gacgccgagg gccagccagt cacgggcatg   1500
aaagatcaga tcaagactga actaaccttc aaaccggctg gaaatattgt gactcgtacc   1560
ctgaaggcca ctaaatcaca ggcaaagcca acactgggtg agttcaccga aactgaagca   1620
ggggtgtatc agtctgtctt tactaccgga acgcagtcag gtgaggcaac gattactgtt   1680
agcgttgatg acatgagcaa aactgtcact gcagaactgc gggccacgat gatggatgtg   1740
tcaaactcca ccctgagtgc taacgagccg tcaggtgatg tggttgctga tggtcagcaa   1800
gcctacacgc tgacactgac agcggtggac tccgagggta atccggtgac gggagaagcc   1860
agccgcctgc gacttgttcc gcaagacact aatggtgtaa ccgttggtgc catttcggaa   1920
ataaaaccag gggtttacag cgccacggtt tcttcgaccc gtgccggaaa cgttgttgtg   1980
cgtgccttca gcgagcagta tcagctgggc acattacaac aaacgctgaa gtttgttgcc   2040
gggccgcttg atgcagcaca ttcgtccatc acactgaatc ctgataaacc ggtggttggc   2100
ggtacagtta cggcaatctg gacggcaaaa gatgctaatg acaaccctgt aactggcctc   2160
aatccggatg caccgtcatt atcgggcgca gctgctgctg gttctacggc atcaggctgg   2220
acggataatg gcgacgggac ctggactgcg cagatttctc tcggcactac ggcgggtgaa   2280
ttagacgtta tgccgaagct caatgggcag gacgcggcag caaatgcggc aaaagtaacc   2340
gtggtggctg atgcattatc ttcaaaccag tcgaaagtct ctgtcgcaga agatcacgta   2400
aaagccggtg aaagcacaac cgtaacgctg gtggcgaaag atgcgcatgg caacgctatc   2460
agtggtcttt cgttgtcggc aagtttgacg gggaccgcct ctgaaggggc gaccgtttcc   2520
agttggaccg aaaaaggtga cggttcctat gttgctacgt taactacagg cggaaagacg   2580

ggcgagcttc gtgtcatgcc gctcttcaac ggccagcctg cagccaccga agccgcgcag   2640
ctgactgtta ttgccggaga gatgtcatca gcgaactcta cgcttgttgc ggacaataaa   2700
actccaacgg ttaaaacgac gacggaactc accttcacca tgaaggatgc gtacgggaat   2760
ccggtcaccg ggctgaagcc agatgcacca gtgtttagtg gtgccgccag cacggggagt   2820
gagcgtcctt cagcaggaaa ctggacagag aaaggtaatg gggtctacgt gtcgacctta   2880
acgctgggat ctgccgcggg tcagttgtct gtgatgccgc gagtgaacgg ccaaaatgcc   2940
gttgctcagc cactggtgct gaatgttgca ggtgacgcat ctaaggctga gattcgtgat   3000
atgacagtga aggttaataa ccaactggct aatggacagt ctgctaacca gatcaccctg   3060
accgtcgtgg acagctatgg taacccgttg caggggcaag aagttacgct gacttaccg    3120
cagggtgtga ccagcaagac ggggaataca gtaacaacca atgcggcagg gaaagtggac   3180
attgagctta tgtcaacggt tgcaggggaa cttgagatcg aggcctcggt gaaaaactct   3240
cagaagacgg tcaaggtgaa attcaaggcg gatttcagta ccggtcaggc gagcctggag   3300
gtagacgccg ctgctcaaaa agtggcaaac ggcaaagatg cctttacgct gacggcaacg   3360
gttaaggatc aatacggcaa ccttcttcct ggcgctgtgg tcgtctttaa tctgcctcgg   3420
ggcgtcaaac cgcttgcaga cggtaatatc atggtgaacg ccgacaagga gggtaaagcg   3480
gaactgaaag tggtttccgt gactgccgga acctatgaga tcacggcgtc agcaggaaat   3540
gaccagcctt cgaatgcgca gtctgtaacg tttgtggctg ataagactac ggcgaccatc   3600
tccagtattg aggtgattgg caaccgtgca gtggcggacg gcaaaaccaa acagacgtat   3660
aaagttacgg tgactgatgc caataacaac ctgctgaaag atagcgaagt gacgctgact   3720
gccagcccgg aaaatttagt tctgactccc aatgggacgg cgacaacgaa tgagcaaggg   3780
caggctattt tcaccgccac gaccactgtc gcagcgacat atacactcac ggcgaaagtg   3840
gaacaggccg acggtcagga atcgacgaaa actgccgaat ctaaattcgt cgcggatgat   3900
aaaaacgcgg tgctcgctgc atctccagag cgtgtagatt ctctggtggc ggacgggaag   3960
actactgcaa cactgacggt tactctgatg tcgggtgtca accccgtagg aggaaccatg   4020
tgggtcgaca ttgaggctcc ggaaggggtg acagaggcgg attatcagtt cctgccgtcg   4080
aaaaatgacc atttcgcgag cgggaaaatc acgcgtacat ttagtaccaa caagccaggt   4140
acatacacat tcacattcaa ctctttgaca tatggagggt atgaaatgaa accagtgact   4200
gtgacaatta acgccgttcc tgcagatact gaaggcgctg aggagaaata a            4251
```

<210> 2

<211> 1416

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

```
Met Ser Arg Tyr Lys Thr Asp Asn Lys Gln Pro Arg Phe Arg Tyr Ser
1               5                  10                  15

Val Leu Ala Arg Cys Val Ala Trp Ala Asn Ile Ser Val Gln Val Leu
            20                  25                  30

Phe Pro Leu Ala Val Thr Phe Thr Pro Val Met Ala Ala Arg Ala Gln
        35                  40                  45

His Ala Val Gln Pro Arg Leu Ser Met Glu Asn Thr Thr Val Thr Ala
    50                  55                  60

Asp Asn Asn Val Glu Lys Asn Val Ala Ser Leu Ala Ala Asn Ala Gly
65                  70                  75                  80

Thr Phe Leu Ser Ser Gln Pro Asp Ser Asp Ala Thr Arg Asn Phe Ile
                85                  90                  95

Thr Gly Met Ala Thr Ala Lys Ala Asn Gln Glu Ile Gln Glu Trp Leu
            100                 105                 110

Gly Lys Tyr Gly Thr Ala Arg Val Lys Leu Asn Val Asp Lys Asn Phe
        115                 120                 125

Ser Leu Lys Asp Ser Ser Leu Glu Met Leu Tyr Pro Ile Tyr Asp Thr
    130                 135                 140

Pro Thr Asn Met Leu Phe Thr Gln Gly Ala Ile His Arg Thr Asp Asp
145                 150                 155                 160

Arg Thr Gln Ser Asn Ile Gly Phe Gly Trp Arg His Phe Ser Glu Asn
                165                 170                 175

Asp Trp Met Ala Gly Val Asn Thr Phe Ile Asp His Asp Leu Ser Arg
```

```
545                 550                 555                 560

Ser Val Asp Asp Met Ser Lys Thr Val Thr Ala Glu Leu Arg Ala Thr
                565                 570                 575

Met Met Asp Val Ser Asn Ser Thr Leu Ser Ala Asn Glu Pro Ser Gly
            580                 585                 590

Asp Val Val Ala Asp Gly Gln Gln Ala Tyr Thr Leu Thr Leu Thr Ala
        595                 600                 605

Val Asp Ser Glu Gly Asn Pro Val Thr Gly Glu Ala Ser Arg Leu Arg
    610                 615                 620

Leu Val Pro Gln Asp Thr Asn Gly Val Thr Val Gly Ala Ile Ser Glu
625                 630                 635                 640

Ile Lys Pro Gly Val Tyr Ser Ala Thr Val Ser Ser Thr Arg Ala Gly
                645                 650                 655

Asn Val Val Val Arg Ala Phe Ser Glu Gln Tyr Gln Leu Gly Thr Leu
            660                 665                 670

Gln Gln Thr Leu Lys Phe Val Ala Gly Pro Leu Asp Ala Ala His Ser
        675                 680                 685

Ser Ile Thr Leu Asn Pro Asp Lys Pro Val Val Gly Gly Thr Val Thr
    690                 695                 700

Ala Ile Trp Thr Ala Lys Asp Ala Asn Asp Asn Pro Val Thr Gly Leu
705                 710                 715                 720

Asn Pro Asp Ala Pro Ser Leu Ser Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ser Thr
                725                 730                 735

Ala Ser Gly Trp Thr Asp Asn Gly Asp Gly Thr Trp Thr Ala Gln Ile
            740                 745                 750

Ser Leu Gly Thr Thr Ala Gly Glu Leu Asp Val Met Pro Lys Leu Asn
        755                 760                 765

Gly Gln Asp Ala Ala Ala Asn Ala Ala Lys Val Thr Val Val Ala Asp
    770                 775                 780

Ala Leu Ser Ser Asn Gln Ser Lys Val Ser Val Ala Glu Asp His Val
785                 790                 795                 800

Lys Ala Gly Glu Ser Thr Thr Val Thr Leu Val Ala Lys Asp Ala His
                805                 810                 815

Gly Asn Ala Ile Ser Gly Leu Ser Leu Ser Ala Ser Leu Thr Gly Thr
            820                 825                 830

Ala Ser Glu Gly Ala Thr Val Ser Ser Trp Thr Glu Lys Gly Asp Gly
        835                 840                 845

Ser Tyr Val Ala Thr Leu Thr Thr Gly Gly Lys Thr Gly Glu Leu Arg
    850                 855                 860

Val Met Pro Leu Phe Asn Gly Gln Pro Ala Ala Thr Glu Ala Ala Gln
865                 870                 875                 880

Leu Thr Val Ile Ala Gly Glu Met Ser Ser Ala Asn Ser Thr Leu Val
                885                 890                 895

Ala Asp Asn Lys Thr Pro Thr Val Lys Thr Thr Thr Glu Leu Thr Phe
            900                 905                 910

Thr Met Lys Asp Ala Tyr Gly Asn Pro Val Thr Gly Leu Lys Pro Asp
```

915 920 925

Ala Pro Val Phe Ser Gly Ala Ala Ser Thr Gly Ser Glu Arg Pro Ser
930 935 940

Ala Gly Asn Trp Thr Glu Lys Gly Asn Gly Val Tyr Val Ser Thr Leu
945 950 955 960

Thr Leu Gly Ser Ala Ala Gly Gln Leu Ser Val Met Pro Arg Val Asn
965 970 975

Gly Gln Asn Ala Val Ala Gln Pro Leu Val Leu Asn Val Ala Gly Asp
980 985 990

Ala Ser Lys Ala Glu Ile Arg Asp Met Thr Val Lys Val Asn Asn Gln
995 1000 1005

Leu Ala Asn Gly Gln Ser Ala Asn Gln Ile Thr Leu Thr Val Val Asp
1010 1015 1020

Ser Tyr Gly Asn Pro Leu Gln Gly Gln Glu Val Thr Leu Thr Leu Pro
1025 1030 1035 1040

Gln Gly Val Thr Ser Lys Thr Gly Asn Thr Val Thr Thr Asn Ala Ala
1045 1050 1055

Gly Lys Val Asp Ile Glu Leu Met Ser Thr Val Ala Gly Glu Leu Glu
1060 1065 1070

Ile Glu Ala Ser Val Lys Asn Ser Gln Lys Thr Val Lys Val Lys Phe
1075 1080 1085

Lys Ala Asp Phe Ser Thr Gly Gln Ala Ser Leu Glu Val Asp Ala Ala
1090 1095 1100

Ala Gln Lys Val Ala Asn Gly Lys Asp Ala Phe Thr Leu Thr Ala Thr
1105 1110 1115 1120

Val Lys Asp Gln Tyr Gly Asn Leu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Phe
1125 1130 1135

Asn Leu Pro Arg Gly Val Lys Pro Leu Ala Asp Gly Asn Ile Met Val
1140 1145 1150

Asn Ala Asp Lys Glu Gly Lys Ala Glu Leu Lys Val Val Ser Val Thr
1155 1160 1165

Ala Gly Thr Tyr Glu Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn Asp Gln Pro Ser
1170 1175 1180

Asn Ala Gln Ser Val Thr Phe Val Ala Asp Lys Thr Thr Ala Thr Ile
1185 1190 1195 1200

Ser Ser Ile Glu Val Ile Gly Asn Arg Ala Val Ala Asp Gly Lys Thr
1205 1210 1215

Lys Gln Thr Tyr Lys Val Thr Val Thr Asp Ala Asn Asn Asn Leu Leu
1220 1225 1230

Lys Asp Ser Glu Val Thr Leu Thr Ala Ser Pro Glu Asn Leu Val Leu
1235 1240 1245

Thr Pro Asn Gly Thr Ala Thr Thr Asn Glu Gln Gly Gln Ala Ile Phe
1250 1255 1260

Thr Ala Thr Thr Thr Val Ala Ala Thr Tyr Thr Leu Thr Ala Lys Val
1265 1270 1275 1280

Glu Gln Ala Asp Gly Gln Glu Ser Thr Lys Thr Ala Glu Ser Lys Phe

```
                1285                1290                1295

Val Ala Asp Asp Lys Asn Ala Val Leu Ala Ala Ser Pro Glu Arg Val
            1300                1305                1310

Asp Ser Leu Val Ala Asp Gly Lys Thr Thr Ala Thr Leu Thr Val Thr
        1315                1320                1325

Leu Met Ser Gly Val Asn Pro Val Gly Gly Thr Met Trp Val Asp Ile
    1330                1335                1340

Glu Ala Pro Glu Gly Val Thr Glu Ala Asp Tyr Gln Phe Leu Pro Ser
1345                1350                1355                1360

Lys Asn Asp His Phe Ala Ser Gly Lys Ile Thr Arg Thr Phe Ser Thr
                1365                1370                1375

Asn Lys Pro Gly Thr Tyr Thr Phe Thr Phe Asn Ser Leu Thr Tyr Gly
            1380                1385                1390

Gly Tyr Glu Met Lys Pro Val Thr Val Thr Ile Asn Ala Val Pro Ala
        1395                1400                1405

Asp Thr Glu Gly Ala Glu Glu Lys
    1410                1415
```

Reivindicaciones

1. Un polipéptido que comprende: (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2; (c) una secuencia de aminoácidos que es un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2; o (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y que incluye un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2, para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC.

2. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho fragmento comprende al menos un epítopo de células B de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

3. El polipéptido para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho fragmento consiste en (a) el péptido señal N-terminal de dicho polipéptido, (b) dicho polipéptido sin su péptido señal N-terminal, o (c) dicho polipéptido sin 1-10 de su residuo(s) de aminoácido N-terminal.

4. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC.

5. Una composición farmacéutica que comprende dos o más polipéptidos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC.

6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, que comprende además un adyuvante de vacuna.

7. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en el tratamiento o enfermedad y/o prevención de la infección causada por una bacteria ExPEC.

8. El polipéptido para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, o composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la bacteria ExPEC es una bacteria MNEC.

9. Uso de un polipéptido como se define en las reivindicaciones 1 a 3, o una composición inmunogénica como se define en la reivindicación 7, en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmune en un paciente, en el que la respuesta inmunitaria es protectora contra la infección ExPEC.

10. El uso de la reivindicación 9, en el que la bacteria ExPEC es una bacteria MNEC.

FIGURA 1

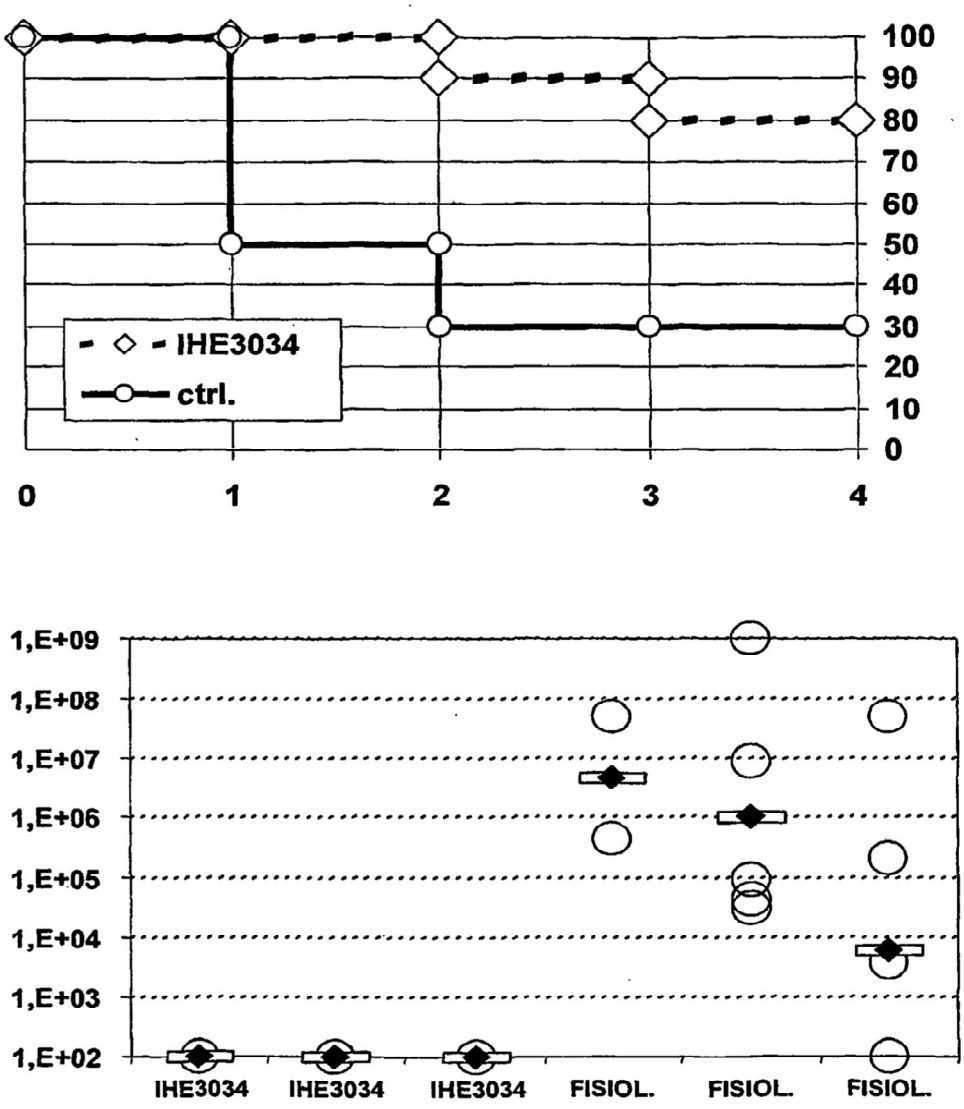
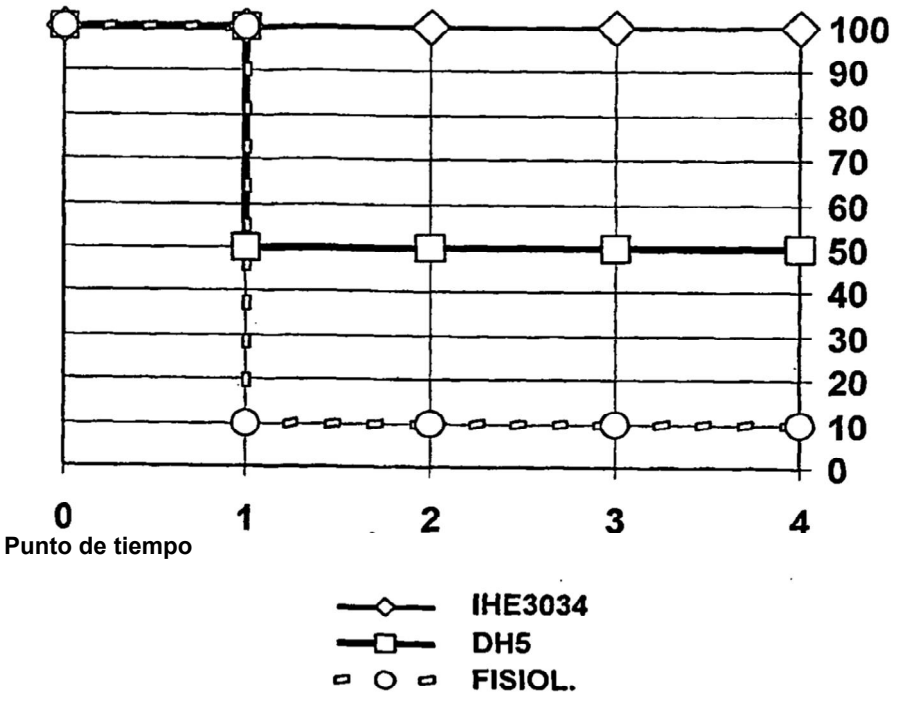

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
IHE3034
ctrl.
1,E+09
1,E+08
1,E+07
1,E+06
1,E+05
1,E+04
1,E+03
1,E+02
IHE3034
IHE3034
IHE3034
FISIOL.
FISIOL.
FISIOL.

FIGURA 2


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
Punto de tiempo
IHE3034
DH5
FISIOL.

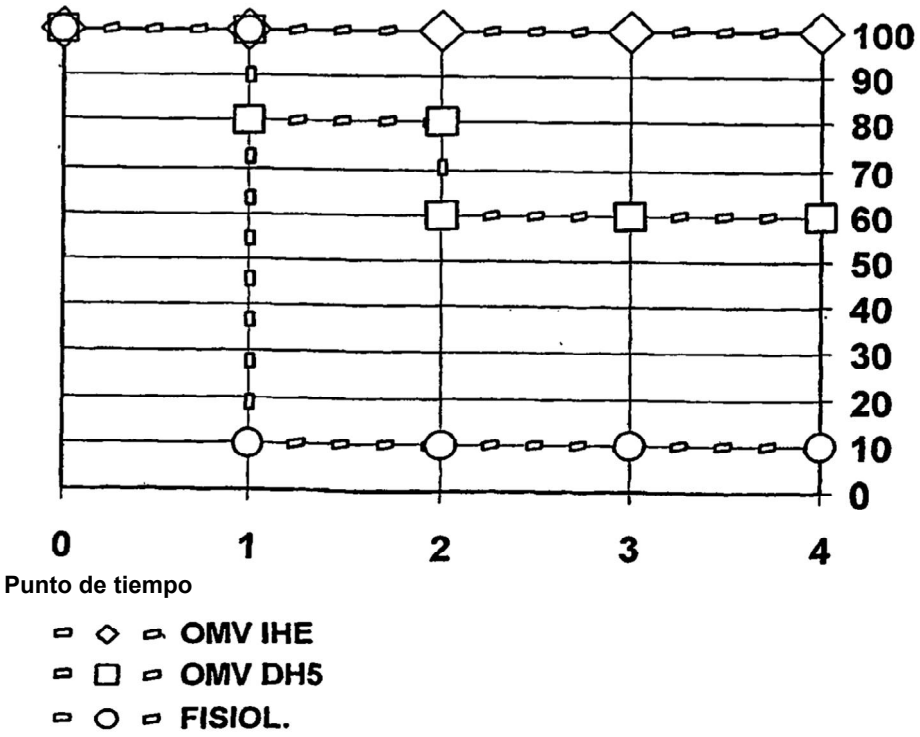
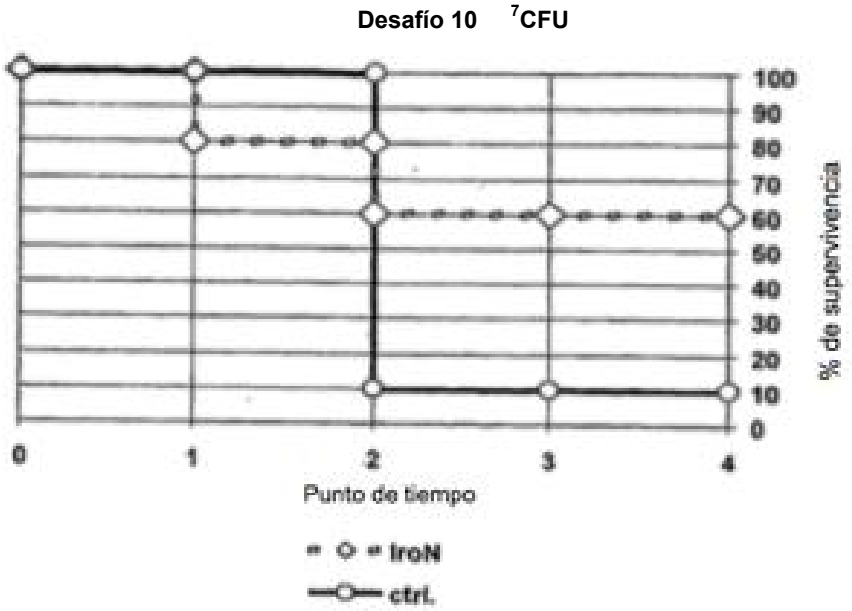

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
Punto de tiempo
OMV IHE
OMV DH5
FISIOL.

FIGURA 3


Desafío 10 ^{7}CFU
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% de supervivencia
0
1
2
3
4
Punto de tiempo
IroN
ctrl.

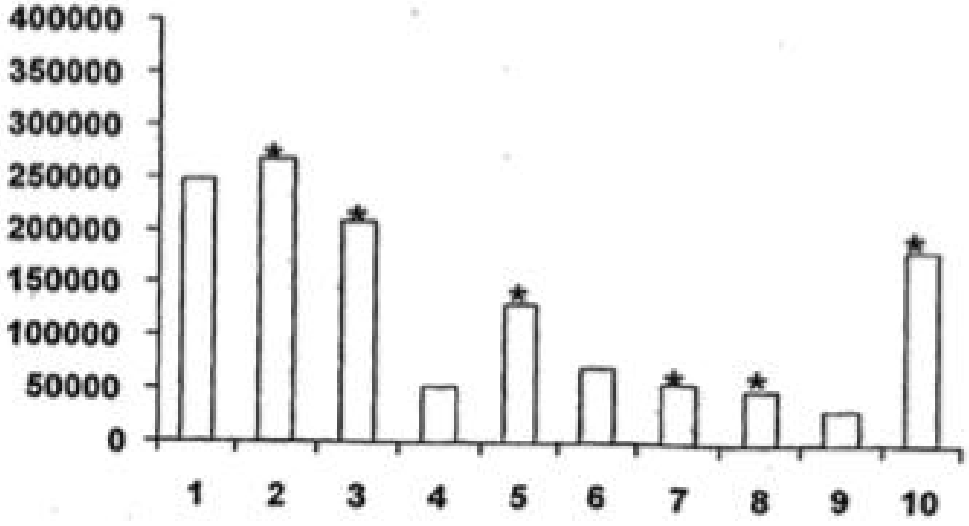
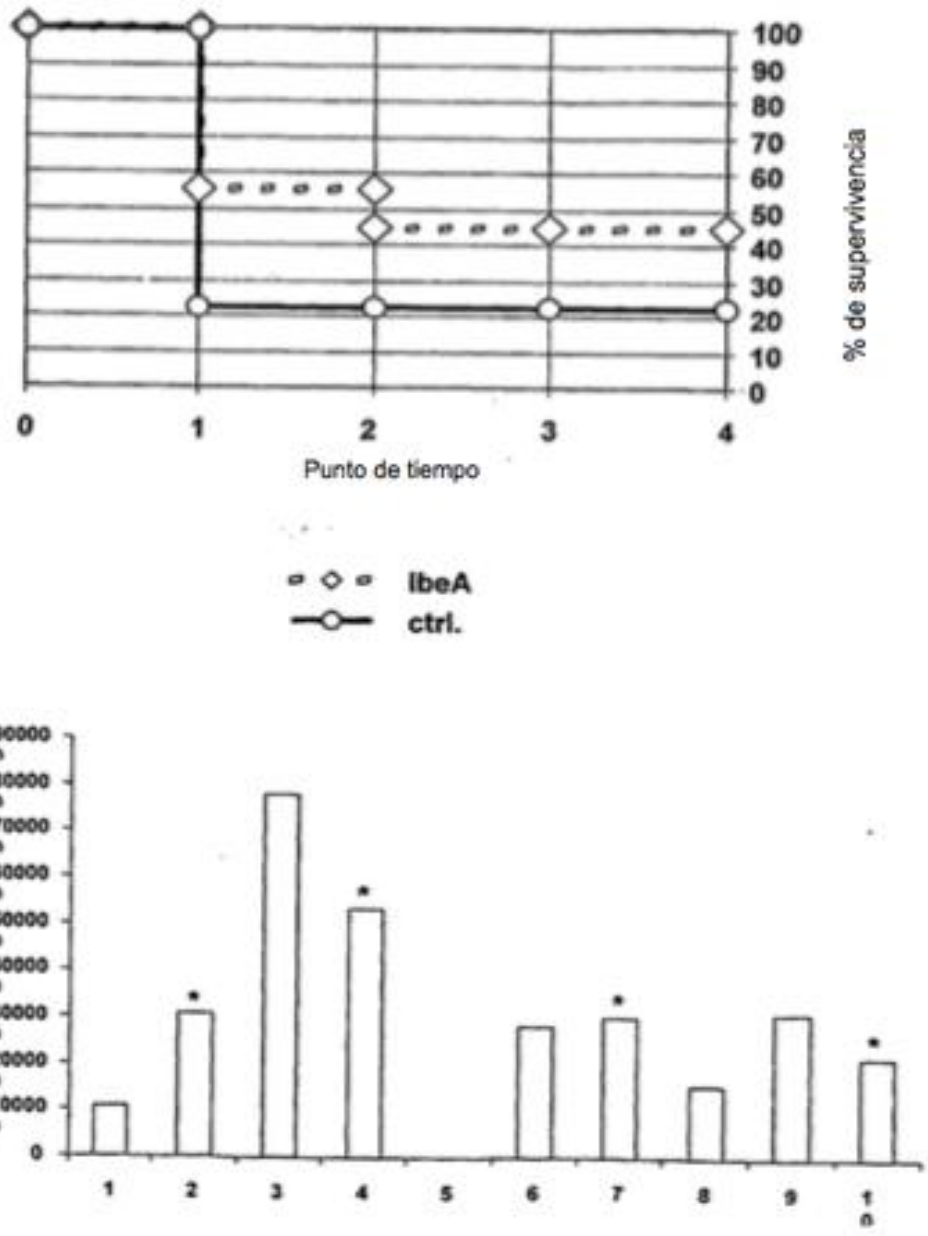

400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

FIGURA 4


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% de supervivencia
0
1
2
3
4
Punto de tiempo
IbeA
ctrl.
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10