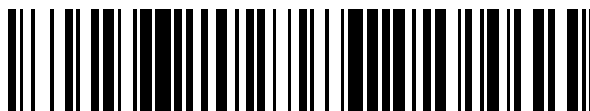


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 395**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/40	(2006.01)
A61K 39/08	(2006.01)
A61K 45/00	(2006.01)
A01N 63/00	(2006.01)
A61K 39/108	(2006.01)
C07K 16/12	(2006.01)
C07K 14/245	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2006 PCT/US2006/000660**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2006 WO06076285**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2006 E 06717818 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 1855718**

54 Título: **Adhesinas complementadas por cadena donadora como inmunógeno contra Escherichia coli**

30 Prioridad:

11.01.2005 US 642771 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2017

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE
NAVY (100.0%)
NAVAL MEDICAL RESEARCH CENTER, 503
ROBERT GRANT AVENUE
SILVER SPRING, MD 20910-7500, US**

72 Inventor/es:

SAVARINO, STEPHEN, J.

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ-VEGA FEIJOO, María Covadonga

ES 2 610 395 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Adhesinas complementadas por cadena donadora como inmunógeno contra *Escherichia coli*

5 **Campo técnico**

La materia de la invención se refiere a una composición inmunogénica y a un uso de una composición inmunogénica para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria contra bacterias diarreogénicas incluyendo *Escherichia coli* enterotoxigénica usando fimbrias bacterianas o componentes fibrilares. La invención contempla el uso de adhesinas de *Escherichia coli* como inmunógenos contra las bacterias diarreogénicas.

Antecedentes de la técnica

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es una causa principal de diarrea en niños pequeños en países con recursos limitados y también en viajeros a estas zonas (1, 2). ETEC produce enfermedad por adherencia a células epiteliales del intestino delgado y expresión de una enterotoxina termolábil (LT) y/o termoestable (ST) (3). ETEC normalmente se adhiere a las células huésped por medio de estructuras filamentosas de la superficie bacteriana conocidas como factores de colonización (CF). Se han descrito más de 20 CF, una minoría de los cuales han sido inequívocamente implicados en la patogénesis (4).

Existen pruebas firmes de que existe un papel patógeno para el antígeno 1 de factor de colonización (CFA/I), el primer CF de ETEC específico de ser humano en describirse. CFA/I es el arquetipo de una familia de ocho fimbrias de ETEC que comparten características bioquímicas y genéticas (5, 4, 6, 7). Esta familia incluye el antígeno de superficie de coli 1 (CS1), CS2, CS4, CS14, CS17, CS19 y el supuesto factor de colonización 071 (PCF071). Se han publicado las secuencias de ADN completas de las agrupaciones génicas que codifican para CFA/I, CS1 y CS2 (8, 9, 10, 11, 12). Se han notificado los genes para la subunidad principal de dos de las otras fimbrias relacionadas (13, 6). Los operones de bioensamblaje de cuatro genes de CFA/I, CS1 y CS2 están organizados de manera similar, codificando (en orden) para una chaperona periplasmática, una subunidad de fimbria principal, una proteína Usher de membrana externa y una subunidad de fimbria secundaria. El ensamblaje de CFA/I tiene lugar a través de la ruta de chaperona alternativa, distinta de la ruta clásica de chaperona-Usher de la formación de fimbrias de tipo I y la de otras estructuras filamentosas tales como pili de tipo IV (14, 15). Basándose en la secuencia primaria de la subunidad de fimbria principal, se han agrupado CFA/I y fimbrias relacionadas como fimbrias de clase 5 (16).

De manera similar, pero distinto de las fimbrias de clase 5, el antígeno de superficie de coli 3 (CS3) representa la fibrilla adhesiva común del complejo de antígeno II de factor de colonización de ETEC (CFA/II). Las ETEC que expresan estos antígenos son prevalentes en muchas partes del mundo. Aunque la naturaleza conformacional de fibrillas que contienen CS3 se entiende incluso menos que la de fimbrias de clase 5, se anticipa que estas estructuras también serán componentes importantes en vacunas anti-ETEC contempladas.

Los estudios de CS1 han proporcionado detalles sobre la composición y las características funcionales de fimbrias de clase 5 (17). El tallo de fimbria de CS1 consiste en subunidades principales CooA de repetición. La subunidad secundaria CooD está supuestamente localizada en la punta de la fimbria, comprende una proporción extremadamente pequeña de la masa de la fimbria y se requiere para el inicio de la formación de la fimbria (18). Contrario a la evidencia anterior que sugiere que la subunidad principal media en la unión (19), hallazgos recientes han implicado a la subunidad secundaria como la adhesina e identificado residuos de aminoácidos específicos requeridos para la adhesión *in vitro* de fimbrias CS1 y CFA/I (20). La estructura de aminoácidos primaria inferida de las subunidades principales que se han secuenciado comparte una gran similitud. Sin embargo, la reactividad cruzada serológica de las fimbrias nativas es limitada, y el patrón de reactividad cruzada se correlaciona con los subtaxones definidos filogenéticamente de las subunidades principales (13).

La implicación de las subunidades secundarias de las fimbrias de clase 5 como las verdaderas adhesinas induce a indagar con respecto al grado de su conservación en relación con el de las subunidades principales. Se especuló que CooD y sus homólogos conservaban una mayor similitud debido a las restricciones funcionales impuestas por los requisitos de unión a ligando y/o su inmunorecividad, atribuible por sí misma a la razón extremadamente grande de subunidades principales con respecto a secundarias en cuanto a composición de la fimbria. Se realizaron estudios para examinar las relaciones evolutivas de las subunidades secundarias y principales de las fimbrias de ETEC de clase 5 así como las dos proteínas de ensamblaje (21). Se demostró que existen distinciones evolutivas entre las subunidades de fimbrias principales y secundarias de clase 5 y que las subunidades secundarias funcionan como adhesinas. Estos hallazgos proporcionan implicaciones prácticas para la investigación relacionada con vacunas.

La secuencia de nucleótidos de las agrupaciones génicas que codifican para CS4, CS14, CS17, CS19 y PCF071 se determinó a partir de aislados asociados a diarrea de tipo natural de ETEC que dieron positivo para cada fimbria respectiva mediante detección basada en anticuerpos monoclonales (21). Los alelos de la subunidad principal de las agrupaciones génicas CS4, CS14, CS17 y CS19 recién secuenciadas mostraron cada uno una identidad de la secuencia de nucleótidos del 99-100% con secuencia(s) génica(s) correspondiente(s) depositada(s) previamente en

GenBank, con no más de cuatro diferencias de nucleótidos por alelo. Cada locus tenía cuatro marcos de lectura abiertos que codificaban para proteínas con homología a las chaperonas de clase CFA/I, subunidades principales, Ushers y subunidades secundarias. Tal como se notificó anteriormente (13), la única excepción fue para la agrupación génica CS14, que contenía dos marcos de lectura abiertos en tándem en el sentido de 3' del gen de chaperona. Sus secuencias de proteína predichas comparten una identidad de aminoácidos del 94% entre sí y son ambas homologas a otras subunidades principales de fimbrias de clase 5.

El examen de las secuencias de aminoácidos inferidas de todos los homólogos de proteína implicados en la biogénesis de fimbrias de clase 5 revela muchas similitudes básicas. A través de los géneros, cada conjunto de homólogos comparten generalmente propiedades fisicoquímicas similares en cuanto a longitud de polipéptido, masa y punto isoeléctrico teórico. Todas las proteínas implicadas contienen un péptido señal amino-terminal que facilita la translocación al periplasma por medio de la ruta de secreción de tipo II. Ninguna de las proteínas de la subunidad principal contiene ningún residuo de cisteína, mientras que el número y la ubicación de seis residuos de cisteína se conservan para todas las subunidades secundarias excepto para el homólogo 3802 de *Y. pestis*, que solo contiene cuatro de estos seis residuos.

Las fimbrias de tipo 1 y P han sido modelos útiles para dilucidar los detalles estructurales y genéticos de fimbrias ensambladas mediante la ruta clásica de chaperona-Usher (23, 24, 25). Un resultado de este trabajo ha sido el desarrollo del principio transformador de la complementación por cadena donadora, un proceso en el que subunidades de fimbria se entrelazan de manera no covalente con subunidades adyacentes compartiendo de manera iterativa entre subunidades una cadena β crítica que falta (22, 26). La evidencia ha implicado a este mismo mecanismo en el plegamiento y en la integridad conformacional cuaternaria de pili hemaglutinantes de *Haemophilus influenzae* (27), y la proteína capsular de *Yersinia pestis*, un polímero de proteína no perteneciente a fimbrias (28). Ambas estructuras son parientes distantes de clase 1 de fimbrias de tipo 1 y P que se ensamblan mediante la ruta clásica de chaperona-Usher. Desde una perspectiva evolutiva, esto sugiere que el mecanismo de complementación por cadena donadora surgió en un sistema de fimbria primordial del que se han derivado las fimbrias existentes de esta clase. Aunque la complementación por cadena donadora representa una disolución biológica inteligente al problema del plegamiento de proteínas no unidas covalentemente, proteínas de superficie polimérica, no se ha demostrado su aprovechamiento por fimbrias adhesivas distintas de las de la ruta clásica de Usher-chaperona.

Común a las fimbrias ensambladas por la ruta alternativa de la chaperona y la ruta clásica de chaperona-Usher son el requisito de que una chaperona periplasmática impida el plegamiento erróneo de la subunidad y una proteína Usher que coreografie la polimerización en la membrana externa. Que el conjunto de fimbrias y los componentes estructurales de estas distintas rutas no compartan similitud de secuencia indica que han surgido a través de trayectorias evolutivas convergentes. No obstante, los análisis computacionales de las subunidades estructurales de CFA/I sugieren la posibilidad de que la complementación por cadena donadora también pueda regular la interacción chaperona-subunidad y subunidad-subunidad.

Las ocho fimbrias de clase 5 de ETEC se agruparon en tres subclases de tres (CFA/I, CS4 y CS14), cuatro (CS1, PCF071, CS17 y CS19) y un (CS2) miembro(s) (denominadas subclases 5a, 5b y 5c, respectivamente) (21). Informes anteriores demostraron que ETEC que llevan CFA/I, CS2, CS4, CS14 y CS19 manifiestan adherencia a células Caco-2 cultivadas (6, 22). Sin embargo, se han publicado datos contradictorios sobre cuál de las subunidades componentes de CFA/I y CS1 median en la adherencia (19, 20).

Esta cuestión de cuál de los componentes de la fimbria es responsable de mediar en la adherencia fue abordada evaluando la actividad de inhibición de la adherencia de anticuerpos frente a fimbrias CFA/I intactas, CfaB (subunidad principal) y frente a las mitades amino-terminal (residuos 23-211) y carboxi-terminal (residuos 212-360) no solapantes de CfaE (subunidad secundaria) en dos modelos diferentes de adherencia *in vitro* (21). Se demostró que el dominio más importante para la adherencia de CFA/I reside en la mitad amino-terminal de la adhesina CfaE (21).

Los estudios brevemente descritos anteriormente proporcionan evidencia de que las subunidades secundarias de CFA/I y otras fimbrias de clase 5 son el resto de unión al receptor (20). Consecuente con estas observaciones, debido a los bajos niveles de divergencia de secuencias de las subunidades secundarias observadas dentro de las subclases de fimbria 5a y 5b (20), las relaciones evolutivas se correlacionaban con la reactividad cruzada de anticuerpos contra la mitad amino-terminal de subunidades secundarias que representan cada una de estas dos subclases (21).

Un aspecto de esta invención es un método de inducción de una respuesta inmunitaria contra cepas de ETEC que incorporan cualquiera o ambas fimbrias de clase 5 o componentes de fimbrias conformacionalmente estables responsables de la adherencia de las fimbrias o fibrillas CS3 o componentes de fibrillas CS3 conformacionalmente estables.

Sumario de la invención

Las reivindicaciones definen la materia para la que se busca protección, cualquier declaración que vaya más allá de

lo que se define en las reivindicaciones se proporciona sólo como información.

Las vacunas disponibles actualmente contra muchas bacterias diarreogénicas, tales como *Escherichia coli* enterotoxigénica no son adecuadamente eficaces. Son críticas nuevas formulaciones de vacunas contra estos organismos, especialmente para los países en desarrollo donde las enfermedades diarreicas son lo más prevalentes y la infraestructura médica es limitada.

Un objeto de la invención es inducir una respuesta inmunitaria, incluyendo respuestas de anticuerpos, contra fimbrias de *Escherichia coli* de clase 5 mediante la administración de polipéptidos que codifican para adhesina de fimbrias o adhesina fibrilar.

Otro objeto todavía adicional es la prevención de la colonización de *Escherichia coli* mediante la inhibición de la adherencia de fimbrias o fibrillas a células huésped.

Un objeto adicional es la construcción de constructos polipeptídicos de adhesina conformacionalmente estables y resistentes a proteasas para su uso en formulaciones de vacunas.

Un objeto todavía adicional es el uso de los constructos polipeptídicos de adhesina para inducir inmunidad frente a fimbrias de *Escherichia coli*, incluyendo *E. coli* enterotoxigénica. Estos y otros objetos de la invención se logran empleando polipéptidos de adhesina de *Escherichia coli* como componente inmunogénico para inducir inmunidad. En particular, la invención proporciona una composición inmunogénica y un uso de una composición inmunogénica según las reivindicaciones 1, 6, 11 y 17.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Efectos inhibitorios de diferentes preparaciones de anticuerpos F_{ab} sobre la adherencia de la cepa H10407 (CFA/I) en dos modelos de adherencia *in vitro*.

Figura 2. Mediana de los títulos de inhibición de la hemaglutinación bovina recíproca (HAI) (representados gráficamente en escala \log_2) de preparaciones de anticuerpos F_{ab} contra fimbrias completas o el dominio amino-terminal de la subunidad secundaria de la fimbria de CFA/I (panel A) y CS 17 (panel B), para cepas de tipo ETEC que expresan el factor de colonización a lo largo del eje x. Los resultados representan la mediana de al menos 4 experimentos, cada uno realizado por duplicado. Los valores de P son para las diferencias en los títulos de HAI entre las fimbrias completas y preparaciones de anticuerpos de subunidad secundaria.

Figura 3. Efectos inhibitorios de anticuerpos F_{ab} contra fimbrias intactas y la mitad N-terminal de la subunidad secundaria de CFA/I (gráficos de barras blancas) y CS17 (gráfico de barras negras) en ensayos de adherencia a células Caco-2 con ETEC que lleva fimbrias homólogas (CFA/I solamente, panel superior izquierdo) y heterólogas.

Figura 4. Un motivo altamente conservado de cadena β en las subunidades estructurales principales de fimbrias de clase 5. Ésta es una alineación múltiple de los extremos amino-terminales de la forma madura de las subunidades principales, con la secuencia consenso mostrada a continuación. Se predice que este lapso forma un motivo de cadena β que abarca los residuos 5-19 (delimitado por flechas amarillas por debajo del consenso). El sombreado de los residuos conservados indica la clase tal como sigue: azul, hidrófobo; rojo, residuos cargados negativamente; turquesa, residuos cargados positivamente; y verde, prolina. Abreviaturas: Bcep, *Burkholderia cepacia*; Styp, *Salmonella typhi*. U, residuo hidrófobo; x, cualquier residuo; Z, E o Q.

Figura 5. Diagramas esquemáticos del constructo de CfaE.

Figura 6. Perfil de elución de dsc_{19} CfaE(His)₆ tras filtración en gel con Superdex 75 (16/60) en MES 20 mM y NaCl 100 mM.

Figura 7. Efectos inhibitorios del antisuero anti-CFA/I y anti- dsc_{19} CfaE(His)₆ sobre la hemaglutinación resistente a manosa (MRHA) de CFA/I-ETEC (cepa prototipo H10407; LTST, CFAI, O78:H11) y ETEC que expresan la subclase relacionada de fimbrias 5a CS4(cepa WS2560B; LTST, CS4+CS6, 025:H-) y CS14 (cepa WS3294A; ST, eS14, 078:H18).

Figura 8. dsc_{19} CfaE(His)₆ purificado en forma particulada induce hemaglutinación resistente a manosa (MRHA) de eritrocitos bovinos y de tipo A humanos.

Figura 9. Inducción de anticuerpos tras la administración orogástrica o intranasal en ratones de dsc CfaE más mLT o CFA/I más mLT.

Figura 10. Actividad de unión a ELISA anti-CfaE y anti-CFA/I mediante ELISA usando o bien dsc CfaE o bien CFA/I como antígeno.

Figura 11. Actividad de HAI de suero de ratones inmunizados con dscCfaE más mL T o CFA/I más mL T.

Figura 12. Inhibición de la hemaglutinación del antisuero policlonal del conejo generado contra fimbrias Cs3 nativas, CstH purificadas, CstG y PeF039.

Figura 13. Representación esquemática de los componentes del constructo de CstH. El panel A ilustra CstH maduro de Cs3 con una etiqueta de histidina unida a su extremo N-terminal. El panel B ilustra el constructo del panel A pero con un polipéptido ligador corto unido al extremo C-terminal del constructo de CstH maduro que a su vez tiene una región N-terminal de CstH de 16 aminoácidos duplicada unida a su extremo C-terminal. El panel C ilustra el constructo del panel A pero con una etiqueta de (His)₆ insertada en el extremo C, frente al extremo N. El panel D ilustra un constructo similar al del panel B pero con una (His)₆ más pequeña en el extremo C de la cadena donadora de región CstH duplicada frente a una (His)₁₀ en el extremo N-terminal.

Figura 14. Análisis de SDS PAGE e inmunotransferencia tipo Western de dsc₁₉CfaE(His)₆ purificado.

Descripción de la invención y el mejor modo de llevar a cabo la invención

Las reivindicaciones definen la materia para la que se busca protección, cualquier declaración que vaya más allá de lo que se define en las reivindicaciones se proporciona sólo como información.

La presente invención se refiere a una composición inmunogénica y a un uso de una composición inmunogénica para la inducción de respuestas inmunitarias anti-adhesivas mediante la administración de fimbrias o componentes de adhesina de fimbrias. Por el presente documento se declara que la información registrada en forma legible por ordenador es idéntica a la lista de secuencias escrita.

La adhesina, el componente molecular distal de fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigénica, son los probables efectores para la unión bacteriana a células huésped (21). Por lo tanto, las adhesinas son críticas para la colonización bacteriana y la patogenicidad.

Una inmunización con subunidades adhesivas de fimbrias de clase 5 inducirá principalmente inmunidad mediada por inmunoglobulina, que se une específicamente a la adhesina bacteriana para interrumpir la colonización de las bacterias diarreogénicas. La invención, por lo tanto, permitirá una inmunidad superior y más eficaz contra bacterias diarreogénicas. Además, el uso de subunidades de adhesina de fimbrias en lugar de fimbrias intactas o bacterias completas requerirá probablemente menos antígeno significativamente para provocar inmunidad con una eficacia de inmunidad mejorada.

La invención proporciona la inducción de inmunidad mediante la administración de polipéptidos que codifican para adhesina de *Escherichia coli*, que es el componente adhesivo a la célula huésped estructuralmente ubicado en la punta de las fimbrias de *Escherichia coli*. La fimbria arquetipo, antígeno 1 de factor de colonización (CFA/I) se encuentra en las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC) más importantes. Sin embargo, debido a la estrecha relación evolutiva de las adhesinas de ETEC, también pueden utilizarse otras fimbrias de clase 5.

La estabilidad conformacional, y potencialmente la resistencia a proteasas, de polipéptidos de adhesina es importante para garantizar una inmunogenicidad máxima. La integridad conformacional de monómeros de adhesina se confiere por una cadena β donada proporcionada por un monómero de fimbria estructural principal adyacente. Por ejemplo, la estabilidad conformacional de la adhesina CFA/I, CfaE, está proporcionada por la cadena β donadora de CfaB.

Para lograr una inmunidad de adhesina anti-fimbria mejorada, un aspecto de la invención es conferir estabilidad conformacional en las secuencias polipeptídicas de adhesina. Con el fin de garantizar la estabilidad conformacional de inmunógenos de polipéptidos de adhesina con eficacia mejorada concomitante de vacunas, un aspecto de esta invención son constructos de polipéptido diseñados para proporcionar operativamente una cadena P donadora a secuencias polipeptídicas de adhesina adyacentes. Los constructos se componen de polipéptidos de adhesina unidos en extremo C-terminal a un polipéptido ligador que a su vez está unido, en el extremo C-terminal, a un polipéptido que codifica para toda o una parte de una subunidad estructural de fimbria principal, tal como CfaB.

Ejemplo 1

La adhesina es el componente bacteriano más importante de Escherichia coli enterotoxigénica relacionado con vacunas

Unión de fimbrias de clase 5 de *Escherichia coli*.

CFA/I es el arquetipo de una familia de fimbrias de ETEC que comparten características genéticas y bioquímicas (5, 4, 6, 7). Los operones genéticos están compuestos por una chaperona periplasmática, una subunidad de fimbria principal, una proteína Usher de membrana externa y una unidad de fimbria secundaria. Basándose en la secuencia

de la subunidad principal, se han agrupado CFA/1 y fimbrias relacionadas como fimbrias de clase 5 (16, 21). Los estudios han confirmado que existe una distinción funcional confirmada entre las subunidades de fimbria principal y secundaria de clase 5 y que las subunidades secundarias sirven como adhesinas. Por lo tanto, las subunidades secundarias son los componentes más importantes de las fimbrias para la construcción de vacunas.

Se caracterizaron las cepas tipo que expresan individualmente cada una de las fimbrias de ETEC de clase 5 con respecto a la adherencia de eritrocitos por hemaglutinación resistente a manosa (MRHA) con eritrocitos de tipo A humanos, bovinos y de pollo (21). En la tabla 1 se muestran los fenotipos de todas las cepas de ETEC usadas en los experimentos de adhesión. Se aislaron las cepas tipo que expresaron CS1, CS4, CS14, CS17, CS19 y PCFO71 de las heces de los niños pequeños con diarrea, como una parte de un estudio longitudinal de diarrea infantil en Egipto (29).

Se sometieron a prueba cepas de ETEC para determinar la hemaglutinación resistente a manosa (MRHA) con eritrocitos de tipo A humanos, bovinos y de pollo. Los métodos de MRHA se basaron en procedimientos descritos previamente (30). Los resultados se muestran en la tabla 1.

En estos estudios, para la propagación rutinaria y la expresión de proteínas, se cultivaron las bacterias en medio Luria-Bertani (31) o en medio rico (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 2 g de glucosa por l). Para los ensayos de adherencia de cultivo tisular y hemaglutinación, se hicieron crecer los cultivos en agar CFA (32) con o sin adición de 1,5 g de Bacto Bile Salts n.º 3 (Difco, Detroit, MI) por litro. Se añadieron ampicilina (62,5 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) según necesidad para presión de selección. Se recogieron eritrocitos humanos según necesidad de un solo donante voluntario, y se adquirieron eritrocitos bovinos y de pollo de Lampire Laboratories (Pipersville, PA). Se almacenaron los eritrocitos durante hasta dos semanas a 4°C en disolución de Alsever antes de su uso. Justo antes de cada ensayo, se lavaron los eritrocitos y se suspendieron en PBS con D-manosa al 0,5% hasta una concentración final del 3%. Se cultivaron las bacterias durante la noche a 37°C y se suspendieron en PBS con D-manosa al 0,5% hasta una concentración final de aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de colonia (ufc)/ml. Se añadieron volúmenes iguales (25 µl cada uno) de glóbulos rojos al 3%, suspensión bacteriana y PBS con D-manosa al 0,5% y se mezclaron en pocillos en una placa cerámica de 12 pocillos (CoorsTec, Golden, CO), se agitó mediante oscilación sobre hielo durante 20 minutos, se clasificó mediante inspección visual, y se puntuó tal como sigue: negativa, que indica que no hay actividad MRHA; 1+ que indica una reacción escasa y débil; 2+ que denota una reacción moderada; 3+ que indica una reacción fuerte; y 4+ una reacción casi instantánea y completa que involucra a todos los eritrocitos.

También se analizó la adherencia de las subunidades componentes a células Caco-2. Los resultados de estos estudios se muestran también en la tabla 1. Los ensayos de adherencia se realizaron tal como se describió anteriormente (33, 34) con modificaciones menores. En resumen, se mantuvieron células Caco-2 a 37°C en aire complementado con 5% de CO₂ en medio EMEM (medio esencial mínimo, de Eagle, en disolución de sal equilibrada de Earle) complementada con L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 20%, aminoácidos no esenciales 0,1 M, piruvato de sodio 1 mM y bicarbonato sódico 1,5 g/litro. Se sembraron las células en placas de 24 pocillos (Costar, Coming, NY) cargadas con cubreobjetos de vidrio tratados con cultivo tisular (Fisher Scientific), y se incubaron durante 14 días (\pm 1 d) hasta pasada la confluencia, se lavaron con PBS y se cubrieron con 750 µl de EMEM complementado antes del ensayo. Se cultivaron las cepas bacterianas en agar CFA con o sin sales biliares durante la noche a 37°C y se suspendieron hasta 1×10^9 bacteria/ml en EMEM complementado con D-manosa al 1%. Se añadió la suspensión a los pocillos de cultivo tisular a una concentración final de $2,5 \times 10^8$ bacteria/ml. Se incubaron, se lavaron, se fijaron, se tiñeron y se montaron las placas tal como se ha descrito (34), y se observaron microscópicamente. Se contó el número de bacterias adherentes a 100 células seleccionadas aleatoriamente para dar un número promedio de células con al menos 1 bacteria adherente (índice de adherencia 1), y un número de bacterias por célula Caco-2 con al menos una bacteria adherente (índice de adherencia 2). Para cada cepa bacteriana, se realizó un mínimo de 3 experimentos por duplicado para determinar los índices de adherencia, expresados como la media \pm desviación estándar (DE).

Se ha informado previamente que ETEC que portan CFA/I, CS2, CS4, y CS14 y CS19 manifiestan adherencia a células Caco-2 cultivadas (6, 22). Se realizaron ensayos de adherencia a células Caco-2 en cada una de las cepas de tipo ETEC que portaban las fimbrias de clase 5 para confirmar estos hallazgos y cuantificar el nivel de adherencia para cada cepa. Los resultados (tabla 1) indicaron que efectivamente cada una de las cepas que portaban CFA/I, CS4, CS14 y CS2 mostraban adherencia a células Caco-2 de nivel moderado a alto, mientras que se observó un nivel de adherencia menor para la cepa que portaba CS19. En cambio, las cepas que expresan CS1, CS17 y PCFO71 manifiestan niveles mínimos de adherencia. La transformación de las cepas que portan fimbrias de subclase 5b con un plásmido que contiene el regulador positivo de CFA/I, *cfad*, se asoció con un aumento en la adherencia a células Caco-2 solo para la cepa de CS19-ETEC, WS0115A.

Considerando las relaciones evolutivas de las fimbrias de ETEC de clase 5, puede observarse que existen algunas características funcionales distintivas que se correlacionan con su filogenia. Las fimbrias de subclase 5a son distintas de las otras en virtud de su capacidad para producir MRHA de eritrocitos de tipo A humanos. Con la excepción de CS19-ETEC, las fimbrias de la subclase 5b muestran una adherencia débil, si es que existe, a células

Caco-2 cultivadas, lo que las diferencia de las otras dos subclases.

Tabla 1. Fenotipos de adherencia *in vitro* de cepas de tipo ETEC que portan CFA/I y fimbrias de clase 5 relacionadas.

Cepa	CF tipo CFA/I	MRHA			Adherencia ^a a células Caco-2	
		A Humano	Bovino	Pollo	Índice 1 ^b	Índice 2 ^c
H10407	CFA/I	4+	4+	3+	54,3 ± 15,4	14,2 ± 2,7
WS2560B	CS4	2+	2+	1+	26,7 ± 7,0	2,9 ± 1,6
WS3294A	CS14	2+	3+	3+	63,3 ± 5,8	8,2 ± 2,4
WS1974A	CS1	-	3+	-	12,7 ± 8,6	2,1 ± 1,1
WS2173A	PCFO71	-	4+	2+	12,7 ± 6,2	1,8 ± 0,6
WS6788A	CS17	-	4+	-	10,0 ± 2,6	1,1 ± 0,2
WS0115A	CS19	-	4+	2+	19,3 ± 6,0	1,8 ± 0,8
C91f	CS2	-	3+	3+	69,3 ± 4,7	15,1 ± 4,7

^a Representa la media de al menos 3 experimentos, cada uno por duplicado.
^b Proporción media de células Caco-2 con al menos una bacteria adherente (± DE).
^c Número medio de bacterias adherentes por célula Caco-2 célula con al menos una bacteria adherente (± DE)

La adhesina es responsable de la unión de las fimbrias

Con el fin de determinar los componentes de fimbrias responsables de la unión de células huésped, se analizó la capacidad de un anticuerpo específico frente a adhesinas para inhibir la adherencia de las fimbrias CFA/I y CS1 (21). Además se evaluó la cuestión de si el anticuerpo frente a estos restos reaccionaría de manera cruzada según las relaciones evolutivas. Esto se evaluó indirectamente midiendo la actividad de inhibición de la adherencia de anticuerpos frente a la fimbrias CFA/I intactas, CfaB (subunidad principal) y frente a mitades no solapantes de extremos amino terminales (residuos 23-211) y extremos carboxilo terminales (residuos 212-360) de CfaE (subunidad secundaria) en dos modelos diferentes de adherencia *in vitro* (véase SEQ ID No. 4 para la secuencia de CfaE).

Se purificaron las fimbrias CFA/I y CS17 tal como se ha descrito previamente (35, 36). Se prepararon preparaciones de anticuerpos policlonales de conejo contra MBP-CfaB₂₄₋₁₇₀, MBP-CfaE₂₃₋₂₁₁, MBP-CfaE₂₁₂₋₃₆₀, MBP-CsbD₁₉₋₂₁₄, y contras fimbrias CFA/I y CS17 naturales (21). Cada una de estas cepas de *E. coli* anteriores descritas anteriormente, excepto las que expresaban GFA/I, CS1 y CS2, también era la fuente de ADN para el análisis de secuencia del operón de fimbria correspondiente. Se obtuvo *E. coli* BL21 (F⁻ *ompT* hsdSB(rB⁻mB⁻) *gal dcm*) de una fuente comercial (New England Biolabs, Beverly, MA) y se usó para la clonación y expresión de fusiones de proteína de unión a maltosa (MBP). Las inmunizaciones de conejos y la recogida de antisuero se realizaron por Harlan Bioproducts for Science, Inc. (Indianápolis, EN). Se derivó IgG purificada de cada antisuero usando columnas Hi-Trap Protein G según lo indicado por el fabricante (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). A partir de cada una de estas preparaciones, se generaron fragmentos F_{ab} usando el kit de preparación de F_{ab} Pierce ImmunoPure (Pierce, Ockford, IL).

Se sometieron a prueba cepas de ETEC para determinar la hemaglutinación resistente a manosa (MRHA). Para los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HAI), se usó cada cepa bacteriana a una concentración correspondiente a dos veces el título de hemaglutinación mínimo (2XMHT). Se determinó el MHT al comienzo de cada día de ensayo de HAI realizando diluciones en serie de dos veces de la suspensión bacteriana (a partir de una concentración inicial de 1 x 10¹⁰ ufc/ml) en PBS. Se añadió un total de 25 µl de cada dilución a volúmenes iguales de suspensión de eritrocitos al 3% y PBS con D-manosa al 0,5% y se agitó mediante oscilación sobre hielo. Se definió el MHT como el recíproco de la menor concentración de bacterias que muestran al menos 1 + MRHA. Para determinar el título de HAI de cada preparación de anticuerpos F_{ab}, se preparó una dilución en serie de dos veces comenzando con la dilución madre de anticuerpos (2 mg/ml). Se añadió un volumen de 25 µl de cada dilución de F_{ab} a un volumen igual de una suspensión bacteriana 2xMHT en los pocillos de la placa de cerámica y se preincubó a temperatura ambiente con agitación mediante oscilación durante 20 min. A continuación, se añadió a cada pocillo un volumen igual de suspensión de eritrocitos (3%), se agitaron mediante oscilación las placas sobre hielo durante 20 minutos, y se puntuó la MRHA como anteriormente. Se expresó el título de HAI como el recíproco de la dilución más alta de antisuero que inhibía completamente MRHA.

Para los experimentos de inhibición de la adherencia a células Caco-2, se añadió una alícuota de 120 µl de la preparación de anticuerpos F_{ab} (concentración inicial 2 mg/ml) a 480 µl de la suspensión bacteriana y se preincubó a temperatura ambiente durante 20 min. La adición de PBS en lugar de la preparación de anticuerpos sirvió como control negativo en cada experimento. Se añadió después una alícuota de 250 µl de la mezcla de bacterias/anticuerpos (2,5 x 10⁸ bacterias/ml) a pocillos de cultivo tisular. Se incubaron, se procesaron y se analizaron las células tal como se ha descrito anteriormente. Se determinó el nivel de inhibición comparando el índice de adherencia primaria con y sin adición de anticuerpos. Para cada preparación de bacterias/anticuerpos de

ensayo, se realizó un mínimo de 3 experimentos por duplicado. En los estudios de adherencia a Caco-2, se comparó la adherencia llevada a cabo en presencia de cada preparación de anticuerpos con la adición de PBS, usando una prueba de la T de Student de unilateral, suponiendo una varianza desigual entre las muestras. Para los experimentos de HAI, se compararon títulos recíprocos entre grupos experimentales usando la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras emparejadas (unilateral) usando el software de análisis de datos XLSTAT.

Se evaluó para cada una de las cuatro preparaciones de anticuerpos para determinar su capacidad para inhibir la adherencia de la cepa H10407 (CFA/I) en ensayos de adherencia a células Caco-2 y MRHA. La figura 1 (A) muestra los títulos medios de inhibición de la hemaglutinación recíproca (HAI) de anticuerpos F_{ab} específicos para MBP, CFA/I, CfaB, CfaE₂₃₋₂₁₁ (denominado CfaE_N) y CfaE₂₁₂₋₃₆₀ (denominado CfaE_C), representados en escala \log_2 . Los valores por debajo de un recíproco de 2 (límite de detección) se representaron arbitrariamente como 1,05 para propósitos de representación gráfica. La figura 1 (B) muestra el índice medio de adherencia a células Caco-2 (% de células Caco-2 con al menos 1 bacteria adherente \pm DE) de H10407 tras la preincubación de bacterias con anticuerpos F_{ab} con las mismas especificidades. Se sometieron a prueba todas las preparaciones en al menos tres experimentos, cada uno realizado por duplicado.

Se observó la actividad más alta de inhibición de la hemaglutinación (HAI) de eritrocitos A humanos con F_{ab} específicos para CfaE₂₃₋₂₁₁, mientras que los anticuerpos frente a CfaB manifiestan un nivel mucho más bajo de actividad de HAI (figura 1 (A)). No se detectó actividad de HAI con anticuerpos F_{ab} contra CFA/I o CfaE₂₁₂₋₃₆₀. Se observaron hallazgos coherentes en ensayos de inhibición de la adherencia a células Caco-2, en los que la actividad inhibidora más alta era atribuible a las fracciones de F_{ab} anti-CfaE₂₃₋₂₁₁ (figura 1(B)). En este ensayo, los anticuerpos F_{ab} anti-CFA/I mostraron un nivel de inhibición más bajo, y las preparaciones específicas para CfaB y CfaE₂₁₂₋₃₆₀ no mostraron ningún efecto detectable. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el dominio más importante para la adherencia de CFA/I reside en la mitad amino-terminal de CfaE.

Para someter a prueba la hipótesis de que las relaciones evolutivas se correlacionarían con la reactividad cruzada de anticuerpos contra la mitad amino-terminal de las subunidades secundarias que representan las subclases 5a y 5b, se evaluó el efecto inhibidor de F_{ab} anti-CfaE₂₃₋₂₁₁ sobre la adherencia de cepas de tipo natural que expresan fimbrias de clase 5 heterólogas. De acuerdo con las predicciones, los anticuerpos anti-CfaE₂₃₋₂₁₁ inhibieron la MRHA bovina de CS4-ETEC y CS14-ETEC (figura 2 (A)). En comparación, los anticuerpos F_{ab} anti-CFA/I inhibieron la MRHA bovina de CFA/I-ETEC en un grado menor que el anticuerpo anti-CfaE₂₃₋₂₁₁, mientras que no inhibieron la MRHA de ETEC que porta CS4 o CS14. Se obtuvieron resultados idénticos usando eritrocitos humanos, excepto que el F_{ab} anti-CFA/I no mostró HAI de CFA/I-ETEC. Ninguna de las preparaciones de anticuerpo inhibió la MRHA bovina de ETEC que porta CF heterólogos de las otras dos subclases.

Se corroboraron estos hallazgos midiendo los efectos inhibidores de cada preparación de F_{ab} en el ensayo de adherencia a células Caco-2. Los anticuerpos anti-CfaE₂₃₋₂₁₁ inhibieron la adherencia de CS4-ETEC y CS14-ETEC cuando se comparó con el nivel de adherencia cuando las bacterias se preincubaron con PBS (figura 3) o con anticuerpos anti-MBP (datos no mostrados). La disminución de la adherencia de CS14-ETEC no logró, sin embargo, significación estadística. A la misma concentración, los anticuerpos anti-CFA/I inhibieron la adherencia a células Caco-2 de H10407 (CFA/I), aunque a un grado significativamente menor que el F_{ab} anti-CfaE₂₃₋₂₁₁. F_{ab} Anti-CFA/I, sin embargo, no inhibió la unión de ETEC que porta CF heterólogos de la misma subclase (figura 3) o diferentes (datos no mostrados).

Para reforzar estos hallazgos, adicionalmente, se produjeron anticuerpos frente a la mitad amino-terminal de la subunidad secundaria CsbD de CS17 (subclase 5b) y se evaluó su actividad inhibidora junto con la de anticuerpos anti-fimbria CS17 en sistemas modelo de células de cultivo tisular MRHA y Caco-2. Tanto los anticuerpos F_{ab} anti-CS17 como anti-CsbD₁₉₋₂₁₄ mostraron actividad de HAI de eritrocitos bovinos para ETEC que portaba CS17, siendo el título de HAI de los anticuerpos anti-CsbD₁₉₋₂₁₄ significativamente mayor (figura 2B). A diferencia de los anticuerpos F_{ab} anti-CS17, la fracción de F_{ab} anti-CsbD₁₉₋₂₁₄ también manifiesta una actividad de HAI significativa para ETEC que porta cada una de las otras fimbrias de subclase 5b. Notablemente, la actividad de HAI de CF heterólogo dentro de una subclase de los anticuerpos anti-CsbD₁₉₋₂₁₄ fue más próxima en magnitud a la actividad de HAI de CS17-ETEC que para los efectos comparables de los anticuerpos anti-CfaE₂₃₋₂₁₁. Se esperaba este hallazgo dado el grado tan alto de identidad de las subunidades secundarias dentro de la subclase 5b. Ninguna de las preparaciones inhibió la MRHA bovina de ETEC que portaba CF de las otras dos subclases.

En el ensayo de adherencia a células Caco-2, se evaluaron los efectos inhibidores de las mismas preparaciones de anticuerpo para CS19-ETEC, las únicas fimbrias de subclase 5b que parecen adherirse específicamente a las células Caco-2. También se encontró en este caso que los anticuerpos anti-CsbD₁₉₋₂₁₄, pero no los anticuerpos anti-CS17, mostraban una inhibición significativa de la adherencia de CS19-ETEC (figura 3). En la figura 3, se muestra la cepa usada en los experimentos encima de cada gráfico. Los ejes y indican el índice de adherencia a células Caco-2 (porcentaje de células Caco-2 con al menos una bacteria adherente). Los resultados representan la media (\pm DE) de al menos 3 experimentos, cada uno realizado por duplicado. Los valores de P son para las diferencias entre el control negativo (PBS) y la preparación de anticuerpo indicada. Ninguna de las preparaciones inhibió la adherencia a células Caco-2 de ETEC que expresa las fimbrias representativas de subclases 5a o 5c (datos no mostrados).

Ejemplo 2

Constructo inmunogénico de adhesina-fimbrias adhesivas de clase 5 complementadas por cadena donadora conformacionalmente estable .

El análisis informático de las subunidades estructurales de CFA/I sugiere que la complementación por cadena donadora rigiere la interacción chaperona-subunidad y subunidad-subunidad. Por lo tanto, se construyó un constructo conformacionalmente estable en el que una cadena β donadora amino-terminal de CfaB proporciona una extensión carboxilo-terminal en *cis* de CfaE para conferir estabilidad conformacional y resistencia a proteasas a esta molécula formando un monómero soluble que puede unirse a eritrocitos humanos.

Se generó una alineación múltiple de las secuencias de aminoácidos de los ocho homólogos de las subunidades principal y secundaria de las fimbrias de ETEC de clase 5 para identificar motivos estructurales comunes. Los algoritmos de predicción de estructura secundaria indicaron que ambas subunidades forman una estructura anfipática rica en cadenas β distribuidas a lo largo de su longitud. Se prevé que el veintiséis por ciento de la secuencia de subunidad secundaria consenso se pliega para dar una conformación β , que comprende 17 cadenas β intercaladas, lo que podría esperarse que formara un núcleo hidrófobo.

Complementación por cadena donadora en *cis* de CfaE.

Se identificaron dos motivos estructurales altamente conservados, uno de los cuales se comparte entre los extremos carboxilo terminales de las subunidades principal y secundaria por igual y otro encontrado en el extremo amino-terminal de la forma madura (escisión tras el péptido señal) de las subunidades principales. La alineación múltiple de las subunidades principal y secundaria entre sí reveló un motivo común en el extremo carboxilo terminal de cada proteína que representa el motivo de secuencia AGxYxGxUxUxUT(x)₃₋₆-COOH, donde U representa cualquier residuo hidrófobo y x representa un residuo de naturaleza no especificada (figura 4). Sakellaris *et al* han sugerido previamente que esta extensión indica un motivo de cremallera- β , análogo al de las subunidades de fimbria de clase I que puede desempeñar un papel en la interacción subunidad de fimbria-chaperona (37).

Las subunidades principales de fimbrias de clase 5 comparten una extensión amino-terminal muy altamente conservada que se prevé que forma una cadena P (figura 4), diferenciándose a este respecto de las subunidades secundarias. Basándose en su ubicación y en la estructura prevista, esta extensión sirve como estructura de tipo cadena β que se dona a las subunidades CfaB vecinas a lo largo del tallo helicoidal alfa y a CfaE en la punta de la fimbria. Para las secuencias que actúan como cadena donadora de la subunidad principal de CfaB, véase la SEQ ID No. 7. Para las cadenas donadoras para otros monómeros de adhesina, véase la SEQ ID No. 8-15.

La naturaleza altamente conservada de la cadena β amino-terminal de CfaB y sus homólogos, junto con el precedente de que el extremo amino terminal de las subunidades de fimbria de tipo 1 funciona como la cadena donadora intercambiada en el ensamblaje de filamentos, sugirió esto como un buen candidato para la cadena β donadora que no interbloquea covalentemente las subunidades de CFA/I. Para someter a prueba esta hipótesis con respecto a la subunidad adhesiva secundaria, se ha diseñado por ingeniería genética un plásmido para expresar una variante de CfaE que contiene una extensión C-terminal que consiste en un ligador de horquilla flexible (DNKQ (SEQ ID No. 1) seguido por los primeros 13 residuos de aminoácidos de CfaB (figura 5). La figura 5(A) ilustra esquemáticamente los dominios de constructos de variantes de CfaE independientes con extensiones C-terminales que comprenden la extensión de la cadena β N-terminal de CfaB que varía en longitud desde 10 hasta 19 residuos. Cada constructo contiene un péptido de ligador corto flexible (DNKQ) intercalado entre el extremo C terminal de la secuencia nativa de CfaE y la cadena β donadora. La flecha vertical identifica la valina de la cadena donadora que se modificó para dar una prolina (V7P) para alterar el motivo secundario de la cadena β . La figura 5 (B) muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo Western de concentrados periplasmáticos de la serie de cepas diseñadas por ingeniería genética para expresar CfaE y las variantes complementadas *en cis* con longitudes variables de la extensión amino-terminal de CfaB maduro. Las preparaciones de anticuerpos primarios usadas fueron anticuerpos policlonales de conejo contra CfaE. Los carriles corresponden a preparaciones de los siguientes constructos: Carril 1, dsc10CfaE; 2, dsc11CfaE; 3, dsc12CfaE; 4, dsc13CfaE; 5, dsc13CfaE[V7P]; 6, dsc14CfaE; 7, dsc16CfaE; 8, dsc19CfaE; y 9, CfaE. Los marcadores de peso molecular (en kD) se muestran a la izquierda. La figura 5 (C) es una representación esquemática de los componentes diseñados por ingeniería genética de dsc19CfaE(His)₆, que contiene la secuencia nativa de CfaE (incluyendo su secuencia señal N-terminal dependiente de Sec), con una extensión en su extremo C-terminal que consiste en una secuencia de ligador corta (es decir, DNKQ), la cadena donadora de 19 residuos del extremo N-terminal de CfaB maduro, y una etiqueta de afinidad hexahistidina terminal.

Se insertaron productos de PCR de *cfaE* en vectores de plásmido mediante recombinación *in vitro* usando el sistema Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usaron cebadores con las siguientes secuencias para la clonación inicial en pDONR207™: dscCfaE 13-1 (directo), 5'-TCG ACA ATA AAC AAG TAG AGA AAA ATA TTA CTG TAA CAG CTA GTG TTG ATC CTT AGC-3' (SEQ ID No. 16); y dsc-CfaE 13-2 (inverso), 5'-TCG AGC TAA GGA TCA ACA CTA GCT GTT ACA GTA ATA TTT TTC TCT ACT TGT TTA TTG-3' (SEQ ID No 17). Se clonaron los productos de PCR flanqueados por sitios de recombinación *attB* en el vector donador pDONR201™ (Gateway® Technology, Invitrogen,

Carlsbad, CA), usando la reacción Gateway BP® para generar el vector de entrada pRA 13.3. Se subclonó adicionalmente la secuencia génica en la reacción Gateway LR® a partir de pRA13.3 en el vector de expresión modificado pDEST14-Kn^r (vector para la expresión natural de un promotor T7) para generar el plásmido pRA14.2. Se construyó el vector pDEST14-Kn^r modificando pDEST14® (Gateway® Technology, Invitrogen, Carlsbad, CA) reemplazando ampicilina por resistencia a kanamicina. Se confirmó la presencia del *cfaE* correcto mediante análisis de secuencia. Se usó la cepa BL21SI™ de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) para determinar la expresión del pRA14.1 y constructos complementados por cadena donadora de CfaE relacionados. Se hicieron crecer los cultivos durante la noche a 30°C en medio LB sin NaCl (LBON) que contiene 50 µg/ml de kanamicina. Se diluyó una alícuota del cultivo durante la noche de 1:50 en medio LBON y se hizo crecer a 30°C. Se añadió, a DO₆₀₀ de 0,5, NaCl hasta una concentración final de 200 mM, y se hicieron crecer las células a 30°C durante 3 horas. Se extrajeron, se lavaron y se recogieron por centrifugación las células inducidas. Se logró la inducción de la expresión de proteínas mediante la adición de NaCl, seguido por fraccionamiento y análisis del contenido periplasmático para determinar la recuperación relativa de cada proteína.

Se encontró que poco CfaE era recuperable de la cepa original que expresaba CfaE natural, mientras que el constructo de dsc₁₃CfaE produjo una banda obvia en el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la fracción periplasmática (figura 5 (B)). Para confirmar que la estabilidad mejorada se relacionaba específicamente con el motivo de la cadena β de la extensión C-terminal, se realizaron mutaciones específicas de sitio en la valina central, cambiándola a cualquiera de cualquiera los dos residuos que se esperaba que rompieran la cadena β. Los constructos resultantes, dsc₁₃CfaE[V7P] y dsc₁₃CfaE[V7S] produjeron poca proteína recuperable, lo que sugiere que la cadena β es importante para la estabilidad observada alcanzada por la extensión C-terminal de 13 aminoácidos (figura 5 (B)).

A continuación, se estableció si existía una restricción de longitud de cadena donadora para la estabilización de CfaE. Se construyeron una serie de plásmidos para expresar variantes de CfaE en el mismo formato general, pero con la cadena β N-terminal de CfaB añadida que variaba desde los diez primeros hasta 19 aminoácidos. Tal como se muestra en la figura 5B, se requirió una longitud de cadena donadora de al menos los 12 primeros aminoácidos para lograr una recuperación de CfaE medible. En el extremo superior de la longitud de la cadena, se encontró que hasta 19 aminoácidos proporcionaban la información necesaria para lograr la recuperación de CfaE.

Formación del complejo chaperona-adhesina y complementación por cadena donadora en *cis*.

Se ha demostrado que CooD, el homólogo CS1 de CfaE, forma un complejo periplasmático con su chaperona relacionada CooB así como con la subunidad de fimbria principal CooA. De manera análoga a las subunidades de fimbria de tipo 1, es posible que una hendidura hidrófoba diferenciada de CooD y CfaE interaccionen no covalentemente con sus respectivas chaperonas en el proceso de biogénesis por el mecanismo de intercambio y complementación por cadena donadora. Para someter a prueba este modelo, se coexpresó una variante de CfaA con etiqueta de hexahistidina C-terminal o bien con CfaE nativo o bien con dsc₁₉CfaE y se buscó la formación de complejos bimoleculares de chaperona–adhesina. Cuando el CfaE nativo se coexpresó con CfaA(His)₆, las dos proteínas se copurificaron mediante cromatografía de afinidad con níquel, indicando la formación de un complejo. En cambio, la coexpresión de dsc₁₉CfaE con CfaA(His)₆ seguido por cromatografía de afinidad produjo solo CfaA(His)₆. Esto sugiere que la cadena β C-terminal a la que contribuye CfaB *en cis* a la excluye la formación del complejo chaperona-adhesina.

Purificación y caracterización de dsc₁₉CfaE(His)₆

Los análisis densiométricos de inmunotransferencias de tipo Western de los diversos constructos de dscCfaE que contenían de 13 a 19 residuos de CfaB revelaron poca diferencia en la recuperación para sugerir una variante sobre otra en términos de ajuste superior. Para garantizar que se estuviera trabajando con una variante de CfaE con la mayor parte de su hendidura hidrófoba cubierta lo más posible, se seleccionó dsc₁₉CfaE para purificación y caracterización. Para facilitar la purificación, se añadió una etiqueta de hexahistidina al extremo carboxilo terminal para producir dsc₁₉CfaE(His)₆, tal como se muestra esquemáticamente en la figura 5 (C).

En la figura 6, un análisis cromatográfico muestra el volumen de elución de dsc₁₉CfaE(His)₆ (flecha), así como controles de peso molecular que incluyen (A) albúmina, 67.000 D; (B) ovoalbúmina, 43.000 D; (C) quimiotripsinógeno A, 25.000 D; y (D) ribonucleasa A, 13.700 D. Se separaron los controles en dos ciclos diferentes (B y D; y A y C), como también dsc₁₉CfaE(His)₆, y se superpusieron los tres cromatogramas. La parte insertada muestra la curva de calibración del derivado de los 4 patrones de peso molecular, cada uno de los cuales funciona como un monómero. Se determinó que el peso molecular de dsc₁₉CfaE(His)₆ era 38.961 D (véase la línea punteada descendente) usando la fórmula $K_{av} = -0,1437\ln(\text{PM}) + 1,6973$, de donde se derivaron la pendiente y la ordenada en el origen de la recta a través de los patrones generados por un ajuste logarítmico ($R^2=0,977$). Esto coincide estrechamente con la masa calculada de dsc₁₉CfaE(His)₆ maduro (M_r , 40940).

Se desarrolló un procedimiento de purificación cromatográfica en dos etapas y se refinó usando afinidad con níquel seguido por intercambio catiónico, lo que produjo dsc₁₉CfaE(His)₆ soluble de aproximadamente el 94% de pureza

(figura 6). Los resultados del análisis de secuencia N-terminal (DKNPGSENMTNTIGPHDRGG) (véase la SEQ ID No. 18) confirmaron la identidad de dsc₁₉CfaE(His)₆ y también validaron la precisión del método de predicción del sitio de escisión del péptido señal de von Heijne (38). En la filtración en gel, el dsc₁₉CfaE(His)₆ maduro mostró un perfil de elución consistente, con un tamaño de 40.869 daltons, indicando que dsc₁₉CfaE(His)₆ existe en un estado monomérico.

La evidencia publicada ha implicado indirectamente a CfaE como el componente adhesivo de las fimbrias CFA/I (20, 21). Para someter a prueba directamente esta premisa, se adsorbió dsc₁₉CfaE(His)₆ sobre perlas de látex de 3 μm y se sometieron a prueba las propiedades de hemaglutinación de estas partículas en presencia de manosa por MRHA (figura 7). En la figura 7, el gráfico superior muestra títulos de HAI de los dos antisueros con eritrocitos bovinos y el panel inferior con eritrocitos de tipo A humanos. Los resultados representan la mediana de al menos 5 experimentos, cada uno realizado por duplicado. Ninguno de los antisueros manifestó actividad de HAI cuando se preincubó con ETEC prototipo que expresan otras fimbrias de clase 5 de las otras dos subclases. Las perlas recubiertas con dsc₁₉CfaE(His)₆ indujeron MRHA de eritrocitos humanos y bovinos. Por el contrario, las perlas recubiertas con CfaB purificada (subunidad principal) no indujeron MRHA de eritrocitos humanos, bovinos o de pollo.

Para corroborar la especificidad del efecto de hemaglutinación de dsc₁₉CfaE(His)₆, se determinó el título de inhibición de hemaglutinación (HAI) del suero anti-dsc₁₉CfaE(His)₆ policlonal de conejo contra CFA/I-ETEC de tipo natural (figura 8). En la figura 8, cada preparación de proteína purificada se adsorbió en perlas de poliestireno de 3 μm, se bloqueó con glicina y se añadió a una suspensión al 3% (vol/vol) de eritrocitos de tipo A humanos (fila 1), bovinos (fila 2) y de pollo (fila 3) en pocillos de placa de porcelana. Se determinó MRHA visualmente tras 20 minutos de agitación mediante oscilación sobre hielo. La columna 2 muestra el fenotipo positivo para MRHA humano y bovino de dsc₁₉CfaE(His)₆ y la columna 3 muestra los fenotipos negativos para MRHA correspondientes de la subunidad principal de CFA/I, dsc₁₉CfaB(His)₆. Las fimbrias naturales de CFA/I (columna 1) y la proteína CfaA(His)₆ chaperona periplasmática de CFA/I (columna 4) sirvieron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Tal como se muestra en la figura 8, el suero anti-dsc₁₉CfaE(His)₆ mostró una mediana de título de HAI de 1:12.288, seis veces mayor pero no estadísticamente diferente de la mediana del título de HAI de suero anti-CFA/I. El suero anti-dsc₁₉CfaE(His)₆ también registró títulos de HAI que superaban los del antisuero anti-CFA/I frente a bacterias que expresaban CS4 y CS14, las dos fimbrias de clase 5 de la misma subclase que CFA/I (figura 8). Ninguno de estos antisueros reveló títulos de HAI detectables contra bacterias que expresan fimbrias de los otros dos subgrupos de clase 5 definidos.

Ubicación ultraestructural de CfaE en fimbrias CFA/I.

Se sugirió previamente que CfaE se ubica en la punta distal de las fimbrias CFA/I basándose en la interferencia de las manipulaciones genéticas y en estudios de fraccionamiento de la superficie bacteriana en bruto (34). Sin embargo, la imprecisión de estos enfoques ha dejado la cuestión de la localización de CfaE abierta a debate. Usando antisuero policlonal de alto título contra CfaE como anticuerpo primario en microscopía inmunoelectrónica (IEM), se encontró un patrón de decoración que apoya definitivamente la localización en las puntas más externas de las fimbrias CFA/I peritricas.

Ejemplo 3

Método para la inducción de inmunidad a un constructo de adhesina de clase 5 conformacionalmente estable

Las adhesinas, ubicadas en la punta distal de las fimbrias de determinadas *E. coli*, son el componente más importante para la inducción de la inmunidad bacteriana contra *E. coli* diarreogénica. Sin embargo, las adhesinas de fimbrias son inherentemente inestables y se someten a degradación cuando están desprovistas de su unión no covalente a los componentes de fimbria de las subunidades principales. Por lo tanto, las mejoras en conferir resistencia a proteasas y estabilidad conformacional son importantes para la producción de la inducción eficaz máxima de la actividad de las células B capaz de conferir inmunidad anti-adhesiva contra *E. coli*, incluyendo *E. coli* enterotoxigénica.

Un aspecto de esta invención es la construcción de un constructo de polipéptido estable, tal como se muestra en el ejemplo 2. Tal como se enseña en el ejemplo 1, la protección contra la patología producida por *E. coli* puede estar mediada por la inhibición de la colonización de bacterias por adhesión de fimbrias que producen impedimento estérico y, por lo tanto, de bacterias, por inducción de una respuesta de células B específicas para regiones de polipéptido de adhesina. Otro aspecto de esta invención, por lo tanto, es la inducción de inmunidad mediante la administración de un constructo de polipéptido conformacionalmente estable.

El constructo comprende un fragmento antigénico que comprende una secuencia de polipéptido de adhesina unida en las regiones C-terminales a un ligador que se une operativamente por sí mismo, en el extremo C-terminal, a un polipéptido de una subunidad de fimbria de estructural principal, tal como CfaB. El fragmento antigénico puede estar constituido por secuencias de polipéptido de adhesina que codifican para cualquier adhesina o fragmento de adhesina de *E. coli* o, alternativamente, para polímeros de polipéptidos de adhesina. Las adhesinas se seleccionan

del grupo que consiste en CfaE, CsfD, CsuD, CooD, CosD, CsdD, CsbD y CotD.

La inducción de colonización mediada por anticuerpos anti-adhesina de bacterias diarreogénicas contiene lo siguiente:

5 a. la estimulación previa es mediante la administración de un inmunógeno que contiene dicho constructo de polipéptido de adhesina conformacionalmente estable. El inmunógeno puede administrarse por vía oral, por vía nasal, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía transcutánea, por vía intramuscular o por vía rectal. El intervalo de una dosis unitaria de inmunógeno es de 50 µg a 1 mg de inmunógeno. El
10 inmunógeno se administra en cualquier cantidad de disoluciones con o sin adyuvante o proteína portadora o adsorbido en partículas tales como microesferas;

15 b. Después de una dosis de estimulación previa, se administran también de 2 a 4 dosis de refuerzo con un intervalo de dosis unitaria de 50 µg a 1 mg de inmunógeno en una disolución acuosa tamponada.

Un enfoque de vacuna alternativo es la administración del constructo de ADN descrito en el ejemplo 2, pero insertado y expresa en células bacterianas huésped. Las células huésped recombinantes pueden administrarse entonces como una vacuna de células completas con el fin de conferir inmunidad no solo a la célula huésped sino también contra los polipéptidos de adhesina recombinantes de ETEC expresados. Las células huésped
20 representativas incluyen, pero no se limitan a *Escherichia coli*, miembros del género *Shigella*, miembros del género *Campylobacter*, miembros del género *Salmonella*, miembros del género *Vibrio* incluyendo *Vibrio cholerae*.

Una inducción de inmunidad de células completas contiene lo siguiente:

25 a. la administración de una dosis de estimulación previa que comprende una cantidad adecuada de bacterias de células completas, seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Vibrio* spp y *Vibrio cholerae*, de manera que el polipéptido de adhesina recombinante expresado es de 50 µg a 1 mg por dosis.

30 b. Después de la dosis de estimulación previa, administración de 1 a 4 dosis de refuerzo de bacterias de células completas, seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Vibrio* spp y *Vibrio cholerae*, de manera que el polipéptido de adhesina recombinante expresado está en el intervalo de 50 µg a 1 mg por dosis. Alternativamente, las dosis de refuerzo pueden ser inmunógeno que contiene dicho constructo de péptido de adhesina resistente a proteasas en un intervalo de dosis unitaria de 50 µg a 1 mg de inmunógeno en
35 una disolución acuosa tamponada.

Como ejemplo específico, se utilizó el constructo descrito en el ejemplo 2 para inducir una respuesta inmunitaria en ratones. La figura 9 muestra las respuestas de IgG e IgA a antígeno homólogo en ELISA después de la
40 administración orogástrica o intranasal de CfaE, CfaE más mLT, CFA/I o CFA/I más mLT. En la figura 9, se administraron a grupos de ratones (n = 6) tres (3) dosis a intervalos de 2 semanas o bien de fimbria (CFA/I) (250 µg), CFA/I (250 µg) más mLT (mLT = toxina termolábil de *E. coli* LTR192G) (10 µg), dscCfaE (250 µg) o dscCfaE (250 µg) más mLT, mLT=LTR 192G (10 µg). Se recogió el suero aproximadamente 42 horas después de la inmunización inicial. Tal como se ilustra en la figura 9, CfaE o fimbria (CFA/I) indujeron una respuesta vigorosa de IgG y IgA y mejoraron significativamente mediante la administración simultánea de mLT. Curiosamente, la administración
45 simultánea de mLT con CfaE o fimbria (CFA/I), intranasal u orogástrica, produjo una mayor respuesta de anticuerpos para CfaE que para CFA/I.

La figura 10 ilustra títulos de anticuerpo específicos frente a o bien CfaE o CFA/I inducidos tras la administración de CfaE frente CFA/I, o bien con mLT. Como en la figura 9, se administraron a grupos de ratones (n = 6) tres (3) dosis
50 a intervalos de 2 semanas de o bien CFA/I (250 µg) más mLT (mLT = toxina termolábil de *E. coli* LTR192G) (10 µg) o bien dscCfaE (250 µg) más mLT, mLT=LTR 192G (10 µg). Tras la inmunización, se midieron los títulos de anticuerpos séricos mediante ELISA usando antígeno homólogo. Las figuras 10 (a) y (b) muestran títulos de anticuerpos inducidos tras la administración orogástrica de CfaE más mLT y las figuras 10 (c) y (d) muestran títulos de anticuerpos inducidos tras la administración intranasal. Tras la administración o bien orogástrica o bien intranasal
55 de CfaE y CFA/I más mLT, la inmunización con dscCfaE dio como resultado un título más alto de respuesta de anticuerpo IgG específica. Estos datos indican que dscCfaE es eficaz, cuando se administra al menos a través de la vía intranasal y orogástrica, en la inducción de una respuesta inmunitaria.

Como se ilustra en la figura 10, dscCfaE puede inducir eficazmente un alto título de anticuerpo. Para determinar si el anticuerpo era funcional, se ilustra el análisis del anticuerpo sérico en la figura 11. La figura 11 (a) muestra el título de HAI del suero obtenido tras la administración intranasal de CFA/I o CfaE y la figura 11 (b) muestra la respuesta de HAI del suero obtenido tras la administración orogástrica. Tal como se ilustra en la figura 11, la inmunización con CfaE indujo una actividad inhibidora mucho más sólida que CFA/I, independientemente de la vía de administración. El aumento de la actividad funcional se correlaciona con el título de anticuerpo anti-CfaE representado en el suero.
65 Colectivamente, estos datos ilustran que el constructo de dscCfaE puede inducir altos títulos de anticuerpos

funcionales.

Ejemplo 4

5 *Método para la inducción de inmunidad a la adhesina de fimbrias de clase 5*

Un aspecto de esta invención es que el componente más importante de fimbrias de *E. coli* para inducir una respuesta inmunitaria contra *E. coli* capaz de prevenir eficazmente la patología bacteriana es la adhesina (tal como se enseña en el ejemplo 1). Estas moléculas se ubican en la punta distal de las fimbrias naturales. Por lo tanto, es importante inducir inmunidad, principalmente una respuesta de células B con la producción concomitante de inmunoglobulina específica para regiones de moléculas de adhesina capaces de inhibir la unión de adhesina a células huésped (véase inhibición de adhesina en el ejemplo 1).

15 La inmunidad mediada por inmunoglobulinas puede ser afectada por impedimento estérico producido por la unión en o cerca del sitio de unión de la célula huésped activa o por la unión a epítomos alejados del sitio de unión de adhesina de la célula huésped. Una inducción de colonización mediada por anticuerpos anti-adhesina de bacterias diarreogénicas contiene lo siguiente:

20 a. la estimulación previa es mediante la administración de un inmunógeno que comprende fimbrias completas que contienen adhesina. Alternativamente, pueden usarse fragmentos aislados de fimbrias, que contienen adhesina o polipéptidos de adhesina solos, en lugar de fimbrias intactas. El inmunógeno puede administrarse por vía oral, por vía nasal, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía transcutánea, por vía intramuscular o por vía rectal. El intervalo de una dosis unitaria de inmunógeno es de 50 µg a 1 mg de inmunógeno. El inmunógeno se administra en cualquier cantidad de disoluciones tamponadas acuosas con o sin adyuvante o proteína portadora;

b. Después de una dosis de estimulación previa, se administran también de 2 a 4 dosis de refuerzo con un intervalo de dosis unitaria de 50 µg a 1 mg de inmunógeno en una disolución acuosa tamponada.

30 Haciendo referencia a la figura 9, la administración orogástrica o intranasal de CFA/I, con o sin el adyuvante mLT indujo una respuesta significativa de IgG sérica tras un régimen de tres (3) dosis. Tal como se ha descrito previamente, se administraron a grupos de ratones (n = 6) tres (3) dosis a intervalos de 2 semanas de o bien CFA/I (250 µg), CFA/I (250 µg) más mLT (mLT =LTR192G) (10 µg), dscCfaE (250 µg) o bien dscCfaE (250 µg) más mLT, mLT=LTR 192G (10 µg). A pesar de la respuesta de anticuerpos sólida tras la inmunización con fimbrias (es decir, CFA/I), tal como se ilustra en la figura 9 y la figura 10, el suero anti-CFA/I contenía una actividad moderada anti-CfaE tal como se ilustra en la figura 10. De acuerdo con esta observación, haciendo referencia a la figura 11, se observó también un título de HAI significativo usando el anticuerpo sérico obtenido tras la administración de CFA/I. Sin embargo, el anticuerpo y las respuestas de HAI a CFA/I, que contiene una punta de adhesina, son mucho menores que las obtenidas cuando se usa CfaE estable (dscCfaE) como inmunógeno, tal como se ilustra en la figura 10 y la figura 11.

Ejemplo 5

45 *Inducción de inmunidad anti-ETEC usando un constructo anti-CS3*

CS3 se compone de dos subunidades distintas, CstH y CstG (Savarino, no publicado). Esta conclusión es contraria a observaciones y conclusiones publicadas anteriormente (39, 40). El CS3 purificado de la cepa de ETEC de tipo natural M424C1 (LTST-CS1+CS3-06:H16) se resolvió en dos banda de proteínas que migran estrechamente en SDS-PAGE, cada una con secuencias de aminoácidos N-terminales distintas. El análisis de secuencias de ADN de la agrupación de genes CS3 de M424C1 reveló dos marcos de lectura abiertos (ORF) contiguos en el extremo 3 prima de la agrupación que codifican para las proteínas CstH y CstG cuyas regiones N-terminales coinciden exactamente con las dos secuencias N-terminales derivadas experimentalmente de CS3 (Savarino SJ, datos no publicados). Estas dos subunidades comparten una similitud del 46% y parecen estar presentes en las fimbrias purificadas en una razón de casi 1:1,5, en comparación con la razón estimada de 1:1000 para las subunidades principal y secundaria de CfaE/CfaB, respectivamente, de CFA/1 (37).

Se encontró, mediante experimentos de mutación y complementación, que ambas subunidades CstH y CstG son necesarios para la expresión de fibrillas CS3. Se diseñaron por ingeniería genética plásmidos recombinantes para que expresaran las fusiones de MBP a las formas escindidas del péptido señal de CstH y CstG, y se usó cada una para generar anticuerpos policlonales de conejo. La preincubación de fracciones Fab e IgG purificadas del anticuerpo anti-MBPCstH pero no del anticuerpo anti-MBPCstG con CS3-ETEC de tipo natural (cepa WS2010A) inhibió la MRHA de eritrocitos bovinos, el fenotipo de unión *in vitro* sustituto de CS3. También se diseñaron por ingeniería genética fusiones de CstH y CstG a un portador de inteína (41), y se purificaron estas proteínas pasajeras mediante cromatografía de afinidad con quitina (New England Biolabs, Ipswich, MA) y autoescisión en columna en la unión proteína pasajera-inteína. Los antiseros policlonales de conejo generados contra CstH purificado pero no contra CstG también mostraron actividad de inhibición de hemaglutinación (HAI), corroborando los resultados

observados con anticuerpos contra las fusiones de MBP correspondientes (véase la figura 12). En la figura 12, se incluyó la reactividad a las fimbrias de PCF039 como control negativo. Los resultados apoyan la teoría de que CstH es la subunidad de CS3 de unión real y, por tanto, puede servir como una diana de vacunas precisa para generar respuestas inmunitarias humorales antiadhesivas.

Basándose en la evidencia disponible que indica que CstH es la adhesina de CS3, se realizaron esfuerzos para diseñar por ingeniería genética un constructo de CstH estable. Tal como se ha mencionado, se clonó CstH como una fusión C-terminal a la inteína (IMPACT-CN™ sistema de expresión, New England Biolabs™). Este sistema ofreció rendimientos y pureza razonables de CstH en el nivel de cultivo del matraz de 1 l. La ampliación en un fermentador hasta 10 l dio como resultado una expresión de alto nivel de producto de fusión inteína-CstH, sin embargo, se limitó en gran medida a la fracción insoluble tras la alteración celular, haciendo esto menos adecuado como sistema para esfuerzos de producción intermedios o a gran escala. Sin embargo, la forma madura sin etiquetas de CstH que se derivó del uso de este sistema permitió la caracterización de proteínas.

La electroforesis en gel nativo y la cromatografía de exclusión molecular indicaron que CstH se autoensambla para dar oligómeros mediante una interacción no covalente ordenada con un intervalo de masa que indica la formación de 4-16 meros de CstH). La microscopía electrónica de alta resolución demostró dos formas morfológicas distintas. Se observaron oligómeros CstH como partículas o bien globulares o bien lineales, y cada tipo mostró cierta variación en tamaño y disposición.

Aunque la formación de partículas de CstH puede conferir algunas propiedades inmunológicas favorables, la heterogeneidad aparente de tal preparación plantea dificultades potenciales en cuanto se refiere al desarrollo de un procedimiento de fabricación reproducible con características de producto final definidas. Por lo tanto, la complementación por cadena donadora se utilizó con el fin de diseñar constructos de CstH estables.

El conjunto fibrilar de CS3 se ha clasificado como un miembro de la ruta clásica de chaperona-Usher (CU) basada en la relación genética de la chaperona periplasmática de CS3 con la superfamilia PapD (42). Curiosamente, se encuentra dentro de la subfamilia FGL (F1-G1 largo), en referencia a una cualidad estructural característica de la chaperona, que media en el ensamblaje de orgánulos adhesivos sin fimbrias o con fimbrias finas (43). La alineación de la extensión de aminoácidos N-terminal de CstH con la subunidad de cápsula F1 de *Yersinia pestis* revela un motivo común de residuos hidrófobos alternantes a través del aminoácido 16 (con referencia al polipéptido CstH maduro). Esta extensión de la subunidad capsular F1 (CafI) funciona como la cadena donadora, interactuando con la chaperona CafM y las subunidades proteicas F1 vecinas durante el ensamblaje capsular y la articulación de subunidades (44).

Considerando que el segmento CstH correspondiente puede funcionar de manera similar, se diseñaron por ingeniería genética dos constructos de CstH complementados por cadena donadora en *cis*. La secuencia de CstH de longitud completa (SEQ ID No. 19) contiene un péptido señal de 22 aminoácidos que normalmente se escinde al entrar en el periplasma para dar la secuencia de CstH maduro (SEQ ID No. 23). La secuencia madura también contiene una cadena β terminal de 16 aminoácidos dada a conocer en la SEQ ID No. 20. La figura 13 ilustra esquemáticamente el diseño del constructo. La figura 13 (A) y la figura 13 (C) ilustran la secuencia de aminoácidos de CstH maduro, pero con la secuencia líder de 22 aminoácidos eliminada y una etiqueta de His insertada. En la figura 13 (A), se inserta una etiqueta de [His]₁₀ en el extremo N-terminal de CstH maduro. En la figura 13 (C), se inserta una etiqueta de [His]₆ en el extremo C-terminal de CstH maduro.

Las figuras 13 (B) y (D) ilustran modificaciones adicionales. La figura 13 (B) ilustra el constructo [His]₁₀dsc₁₆CstH, dado a conocer en SEQ ID No. 21. [His]₁₀dsc₁₆CstH contiene una His₁₀ N-terminal, como en la figura 13 (A) pero con un ligador de horquilla corta (SEO ID No 1, 2 ó 3) fusionado al extremo C-terminal de CstH maduro que está a su vez fusionado en su extremo C-terminal a una cadena donadora duplicada derivada de los primeros 16 aminoácidos del extremo terminal de CstH descrito en SEQ ID No. 20. La figura 13 (D) ilustra esquemáticamente dsc₁₆CstH[His]₆, que se da a conocer como SEO ID No. 22. Este constructo contiene una etiqueta de His en el extremo C, frente al extremo N-terminal, como en [His]₁₀dsc₁₆CstH. Se derivan los dos aminoácidos entre el extremo C-terminal de la cadena donadora en *cis* y la etiqueta de His de la secuencia de codificación lateral de multiclonación del vector de expresión. Se insertó el constructo [His]₁₀dsc₁₆CstH en el plásmido pET 19 de expresión de T7 y se denomina pET19/[His]₁₀dsc₁₆CstH. De manera similar, se insertó el constructo dsc₁₆CstH[His]₆ en pET24 y se denomina pET24/ dsc₁₆CstH[His]₆. El constructo dsc₁₆CstH[His]₆ mostró alta solubilidad.

El análisis electroforético demostró que el constructo expresado mostraba características monoméricas tal como se ilustra en la figura 14. En la figura 14 (A), la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) muestra una banda clara y prominente. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos anti-CstH y anti-CS3 (figuras 14 (B) y (C)), respectivamente, también muestran una banda monomérica claramente prominente.

Se contempla que el constructo de Cs3 va a utilizarse por un método similar al descrito en el ejemplo 3. Por lo tanto, la inducción de inmunidad usando dsc₁₆estH[His]₆, u otras variantes, es por el método que comprende las etapas:

- a. la estimulación previa es mediante la administración del inmunógeno [His]₁₀dsc₁₆CstH o dsc₁₆CstH[His]₆ (es

decir SEQ ID No. 21 o SEQ ID No. 22) o variantes (tal como se ilustra en la figura 13) que contiene dicho constructo de polipéptido de adhesina conformacionalmente estable. El inmunógeno puede administrarse por vía oral, por vía nasal, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía transcutánea, por vía intramuscular o por vía rectal. El intervalo de una dosis unitaria de inmunógeno es de 50 µg a 1 mg de inmunógeno. El inmunógeno se administra en cualquier cantidad de disoluciones con o sin adyuvante o proteína portadora o adsorbido en partículas tales como microesferas;

b. Después de una dosis de estimulación previa, se administran también de 2 a 4 dosis de refuerzo con un intervalo de dosis unitaria de 50 µg a 1 mg de inmunógeno en una disolución acuosa tamponada.

También puede usarse el constructo de CstH expresado en células bacterianas huésped incluyendo *Escherichia coli*, miembros del género *Shigella*, miembros del género *Campylobacter*, miembros del género *Salmonella*, miembros del género *Vibrio* incluyendo *Vibrio cholerae* tal como se describe para el constructo de adhesina de clase 5 en el ejemplo 3.

Bibliografía

1. Black, R. E. 1990. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. Rev Infect Dis 12 (Suppl 1):S73-S79.
2. Huilan, S., L. G. Zhen, M. M. Mathan, M. M. Mathew, J. Olarte, R. Espejo, U. Khin Maung, M. A. Ghafoor, M. A. Khan, Z. Sami, y *et al.* 1991. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. Bull World Health Organ 69:549-55.
3. Nataro, J. P., y J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11:142-201.
4. Gaastra, W., y A. M. Svennerholm. 1996. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Trends Microbiol 4:444-452.
5. Evans, D.G., R. P. Silver, D. J. Evans, Jr., D.G. Chase, y S. L. Gorbach. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. Infect Immun 12:656-667.
6. Grewal, H. M., H. Valvatne, M. K. Bhan, L. van Dijk, W. Gaastra, y H. Sommerfelt. 1997. A new putative fimbrial colonization factor, CS19, of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 65:507-513.
7. Khalil, S. B., F. J. Cassels, H. I. Shaheen, L. K. Pannell, K. A. Kamal, B. T. Pittner, M. Mansour, R. Frenck, S. J. Savarino, y P. L. F. 2000. Presentado en la 100ª General Meeting of the American Society for Microbiology, Los Angeles, CA.
8. Froehlich, B. J., A. Karakashian, L. R. Melsen, J. C. Wakefield, y J. R. Scott. 1994. CooC y CooD are required for assembly of CS1 pili. Mol Microbiol 12:387-401.
9. Froehlich, B. J., A. Karakashian, H. Sakellaris, y J. R. Scott. 1995. Genes for CS2 pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their interchangeability with those for CS1 pili. Infect Immun 63:4849-56.
10. Jordi, B. J. A. M., G. A. Willshaw, A. M. van der Zeijst, y W. Gaastra. 1992. The complete nucleotide sequence of region 1 of the CFA/I fimbrial operon of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. DNA Seq 2:257-263.
11. Perez-Casal, J., J. S. Swartley, y J. R. Scott. 1990. Gene encoding the major subunidad of CS1 pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 58:3594-3600.
12. Scott, J. R., J. C. Wakefield, P. W. Russell, P. E. Orndorff, y B. J. Froehlich. 1992. CooB is required for assembly but not transport of CS1 pilin. Mol Microbiol 6:293-300.
13. Gaastra, W., H. Sommerfelt, L. van Dijk, J. G. Kusters, A. M. Svennerholm, y H. M. Grewal. 2002. Antigenic variation within the subunidad protein of members of the colonization factor antigen 1 group of fimbrial proteins in human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol 292:43-50.
14. Ramer, S. W., G. K. Schoolnik, C. Y. Wu, J. Hwang, S. A. Schmidt, y D. Bieber. 2002. The Type IV pilus assembly complex: Biogenic interactions among the bundle forming pilus proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 184:3457-65.
15. Soto, G. E., y S. J. Hultgren. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. J Bacteriol 181:1059-1071.
16. Low, D., B. Braaten, y M. Van der Woude. 1996. Fimbriae, p. 146-157. En F. C. Neidhardt, R. Curtiss 111, J. L.

- Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S.Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, y H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2ª ed, vol. Volumen 1. ASM Press, Washington, D. C.
- 5 17. Sakellaris, H., y J. R. Scott. 1998. New tools in an old trade: CS1 pilus morphogenesis. *Mol Microbiol* 30:681-7.
18. Sakellaris, H., V. R. Penumalli, y J. R. Scott. 1999. The level of expression of the minor pilin subunit, CooD, determines the number of CS1 pili assembled on the cell surface of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:1694-7.
- 10 19. Buhler, T., H. Hoschutzky, y K. Jann. 1991. Analysis of colonization factor antigen 1, an adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* O78:H11: fimbrial morphology and location of the receptor-binding site. *Infect Immun* 59:3876-3882.
- 15 20. Sakellaris, H., G.P. Munson, y J. R. Scott. 1999. A conserved residue in the tip proteins of CS1 and CFA/I pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* that is essential for adherence. *Proc Natl Acad Sci, USA* 96:12828-12832.
21. Anantha, Ravi P., A. L. McVeigh, L.H. Lee, M. K. Agnew, F.J. Cassels, D. A. Scott, T S. Whittam, y S. J. Savarino. 2004. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen 1 and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Inf and Imm*. 72: 7190-7201.
- 20 22. Viboud, G.I., M. M. McConnell, A. Helander, y A. M. Svennerholm. 1996. Binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing different colonization factors to tissue-cultured Caco-2 cells and to isolated human enterocytes. *Microb Pathogen* 21:139-147.
- 25 23. Kuehn MJ, J. Heuser, S. Normark y S.J. Hultgren. 1992. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* 356:252-5.
24. Sauer FG, K. Futterer, J.S. Pinkner, K.W. Dodson, S.J. Hultgren y G. Waksman. 1999. Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science* 285:1058-61.
- 30 25. Choudhury D, A. Thompson, V. Stojanoff, *et al*. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1999; 285: 1061-6.
26. Barnhart MM, Pinkner JS, Soto GE, *et al*. From the cover: PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97:7709-14.
- 35 27. Krasan GP, Sauer FG, Cutter D, *et al*. Evidence for donor strand complementation in the biogenesis of *Haemophilus influenzae* haemagglutinating pili. *Mol. Microbiol.* 2000; 35:1335-47.
- 40 28. Zavialov AV, Kersley J, Korpela T, Zav'yalov VP, MacIntyre S y Knight SO. Donor strand complementation mechanism in the biogenesis of non-pilus systems. *Mol. Microbiol.* 2002; 45:983-995.
29. Rao, M. R., R. Abu-Elyazeed, S. J. Savarino, A. B. Naficy, T. F. Wierzba, I. Abdel Messih, H. Shaheen, R. W. Frenck, A. M. Svennerholm, y J. D. Clemens. 2003. High disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in early life among rural Egyptian children. *J Clin Microbiol* 41:4862-4864.
- 45 30. Cravioto, A., S. M. Scotland, y B. Rowe. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect Immun* 36:189-197.
- 50 31. Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
32. Evans, D.G., D. J. Evans, Jr., W. S. Tjoa, y H. L. DuPont. 1978. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. *Infect Immun* 19:727-736.
- 55 33. Darfeuille-Michaud, A., D. Aubel, G. Chauviere, C. Rich, M. Bourges, A. Servin, y B. Joly. 1990. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Infect Immun* 58:893-902.
34. Khalil, S. B., F. J. Cassels, H. I. Shaheen, L. K. Pannell, N. El-Ghorab, K. Kamal, M. Mansour, S. J. Savarino, y L. F. Peruski, Jr. 1999. Characterization of an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain from Africa expressing a putative colonization factor. *Infect Immun* 67:4019-4026.
- 60 35. Hall, R. H., D. R. Maneval, Jr., J. H. Collins, J. L. Theibert, y M. M. Levine. 1989. Purification and analysis of colonization factor antigen I, coli surface antigen 1, and coli surface antigen 3 fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171:6372-6374.
- 65

36. Hess, S., F. J. Cassels, y L. K. Pannell. 2002. Identification and characterization of hidrophobic *Escherichia coli* virulence proteins by liquid cromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 302:123-130.
- 5 37. Sakellaris H, D.P. Balding y J. R. Scott. 1996. Assembly proteins of CS1 pili of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21:529-41.
38. Bendtsen J.D., H. Nielsen H, G. von Heijne y S. Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783-95.
- 10 39. Hall, R.H., D.R. Maneval, Jr., J.H. Collins, J.L. Theibert, J.L. y M.M. Levine. 1989. Purification and analysis of colonization factor antigen I, coli surface antigen 1, and coli surface antigen 3 fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Bact.* 171:6372-6374.
- 15 40. Jalajakumari, M.B., C.J. Thomas, R. Halter, y P.A. Manning. 1989. Genes for biosynthesis and assembly of CS3 pili of CFA/II enterotoxigenic *Escherichia coli*: novel regulation of pilus production by bypassing an amber codon. *Mol. Micro* 3:1685-1695.
41. Perler, F.B. 2002. InBase, the Intein Database. *Nuc. Acids. Res.* 30:383-384.
- 20 42. Hung, D.L., S. D. Knight, RM. Woods, J.S. Pinkner y S.J. Hultgren. 1996. Molecular basis of two subfamilies of inmunoglobulina-like chaperones. *EMBO J.* 15:3792-3805.
43. Soto, G.E., S.J. Hultgren. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bact.* 181:1059-1071.
- 25 44. Zavialov, A. V., J. Berglund, A. F. Pudney, *et al.*, 2003. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. *Cell* 113:587-596.

Lista de secuencias

- 30 <110> LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA REPRESENTADOS POR EL SECRETARIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA NAVAL DE LA ARMADA
- <120> ADHESINA COMO INMUNÓGENO CONTRA *ESCHERICHIA COLI*
- 35 <130> 17849EP
- <140> 06 717 818.6
- <141> 10-01-2006
- 40 <150> Documento US 60/642.771
- <151> 11-01-2005
- <160> 23
- 45 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 4
- 50 <212> PRT
- <213> *Escherichia coli*
- <400> 1

Asp Asn Lys Gln

1

- 55 <210> 2
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> *Escherichia coli*
- 60 <400> 2

ES 2 610 395 T3

Gly Asp Asn Lys Gln
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
5 <213> *Escherichia coli*

<400> 3

Gly Asp Asn Lys Gln Gly
1 5

<210> 4
10 <211> 360
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 4

15 **Met Asn Lys Ile Leu Phe Ile Phe Thr Leu Phe Phe Ser Ser Gly Phe**
1 5 10 15

ES 2 610 395 T3

Phe Thr Phe Ala Val Ser Ala Asp Lys Asn Pro Gly Ser Glu Asn Met
 20 25 30
 Thr Asn Thr Ile Gly Pro His Asp Arg Gly Gly Ser Ser Pro Ile Tyr
 35 40 45
 Asn Ile Leu Asn Ser Tyr Leu Thr Ala Tyr Asn Gly Ser His His Leu
 50 55 60
 Tyr Asp Arg Met Ser Phe Leu Cys Leu Ser Ser Gln Asn Thr Leu Asn
 65 70 75 80
 Gly Ala Cys Pro Ser Ser Asp Ala Pro Gly Thr Ala Thr Ile Asp Gly
 85 90 95
 Glu Thr Asn Ile Thr Leu Gln Phe Thr Glu Lys Arg Ser Leu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Glu Leu Gln Ile Lys Gly Tyr Lys Gln Phe Leu Phe Lys Asn Ala
 115 120 125
 Asn Cys Pro Ser Lys Leu Ala Leu Asn Ser Ser His Phe Gln Cys Asn
 130 135 140
 Arg Glu Gln Ala Ser Gly Ala Thr Leu Ser Leu Tyr Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 Glu Leu Asn Lys Leu Pro Phe Gly Gly Val Trp Asn Ala Val Leu Lys
 165 170 175
 Leu Asn Val Lys Arg Arg Tyr Asp Thr Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Ile
 180 185 190
 Asn Ile Thr Val Asn Leu Thr Asp Lys Gly Asn Ile Gln Ile Trp Leu
 195 200 205
 Pro Gln Phe Lys Ser Asn Ala Arg Val Asp Leu Asn Leu Arg Pro Thr
 210 215 220
 Gly Gly Gly Thr Tyr Ile Gly Arg Asn Ser Val Asp Met Cys Phe Tyr
 225 230 235 240
 Asp Gly Tyr Ser Thr Asn Ser Ser Ser Leu Glu Ile Arg Phe Gln Asp
 245 250 255
 Asp Asn Ser Lys Ser Asp Gly Lys Phe Tyr Leu Lys Lys Ile Asn Asp
 260 265 270

ES 2 610 395 T3

Asp Ser Lys Glu Leu Val Tyr Thr Leu Ser Leu Leu Leu Ala Gly Lys
 275 280 285

Asn Leu Thr Pro Thr Asn Gly Gln Ala Leu Asn Ile Asn Thr Ala Ser
 290 295 300

Leu Glu Thr Asn Trp Asn Arg Ile Thr Ala Val Thr Met Pro Glu Ile
 305 310 315 320

Ser Val Pro Val Leu Cys Trp Pro Gly Arg Leu Gln Leu Asp Ala Lys
 325 330 335

Val Lys Asn Pro Glu Ala Gly Gln Tyr Met Gly Asn Ile Lys Ile Thr
 340 345 350

Phe Thr Pro Ser Ser Gln Thr Leu
 355 360

<210> 5
 <211> 170
 <212> PRT
 5 <213> *Escherichia coli*

<400> 5

Met Lys Phe Lys Lys Thr Ile Gly Ala Met Ala Leu Thr Thr Met Phe
 1 5 10 15

Val Ala Val Ser Ala Ser Ala Val Glu Lys Asn Ile Thr Val Thr Ala
 20 25 30

Ser Val Asp Pro Ala Ile Asp Leu Leu Gln Ala Asp Gly Asn Ala Leu
 35 40 45

Pro Ser Ala Val Lys Leu Ala Tyr Ser Pro Ala Ser Lys Thr Phe Glu
 50 55 60

Ser Tyr Arg Val Met Thr Gln Val His Thr Asn Asp Ala Thr Lys Lys
 65 70 75 80

Val Ile Val Lys Leu Ala Asp Thr Pro Gln Leu Thr Asp Val Leu Asn
 85 90 95

Ser Thr Val Gln Met Pro Ile Ser Val Ser Trp Gly Gly Gln Val Leu
 100 105 110

Ser Thr Thr Ala Lys Glu Phe Glu Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Ser Ala
 115 120 125

ES 2 610 395 T3

Ser Gly Val Asn Gly Val Ser Ser Ser Gln Glu Leu Val Ile Ser Ala
 130 135 140

Ala Pro Lys Thr Ala Gly Thr Ala Pro Thr Ala Gly Asn Tyr Ser Gly
 145 150 155 160

Val Val Ser Leu Val Met Thr Leu Gly Ser
 165 170

<210> 6

<211> 170

<212> PRT

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 6

Met Lys Phe Lys Lys Thr Ile Gly Ala Met Ala Leu Thr Thr Met Phe
 1 5 10 15

Val Ala Val Ser Ala Ser Ala Val Glu Lys Asn Ile Thr Val Thr Ala
 20 25 30

Ser Val Asp Pro Val Ile Asp Leu Leu Gln Ala Asp Gly Asn Ala Leu
 35 40 45

Pro Ser Ala Val Lys Leu Ala Tyr Ser Pro Ala Ser Lys Thr Phe Glu
 50 55 60

Ser Tyr Arg Val Met Thr Gln Val His Thr Asn Asp Ala Thr Lys Lys
 65 70 75 80

Val Ile Val Lys Leu Ala Asp Thr Pro Gln Leu Thr Asp Val Leu Asn
 85 90 95

Ser Thr Val Gln Met Pro Ile Ser Val Ser Trp Gly Gly Gln Val Leu
 100 105 110

Ser Thr Thr Ala Lys Glu Phe Glu Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Ser Ala
 115 120 125

Ser Gly Val Asn Gly Val Ser Ser Ser Gln Glu Leu Val Ile Ser Ala
 130 135 140

Ala Pro Lys Thr Ala Gly Thr Ala Pro Thr Ala Gly Asn Tyr Ser Gly
 145 150 155 160

Val Val Ser Leu Val Met Thr Leu Gly Ser
 165 170

ES 2 610 395 T3

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

5
<400> 7

Val Glu Lys Asn Ile Thr Val Thr Ala Ser Val Asp Pro Val Ile Asp
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ala
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

10
<400> 8

Val Glu Lys Asn Ile Thr Val Thr Ala Ser Val Asp Pro Thr Ile Asp
1 5 10 15

Ile Leu Gln Ala
20

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

15
<400> 9

Val Glu Lys Asn Ile Thr Val Thr Ala Ser Val Asp Pro Thr Ile Asp
1 5 10 15

Ile Leu Gln Ala
20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

25
<400> 10

Val Glu Lys Asn Ile Thr Val Thr Ala Ser Val Asp Pro Thr Ile Asp
1 5 10 15

Ile Leu Gln Ala
20

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

30
<400> 11

ES 2 610 395 T3

Val Glu Lys Thr Ile Ser Val Thr Ala Ser Val Asp Pro Thr Val Asp
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ser
20

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
5 <213> *Escherichia coli*

<400> 12

Val Glu Lys Asn Ile Thr Val Arg Ala Ser Val Asp Pro Lys Leu Asp
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ala
20

10 <210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 13

Val Glu Lys Asn Ile Thr Val Arg Ala Ser Val Asp Pro Lys Leu Asp
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ala
20

15 <210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

20 <400> 14

Ala Glu Lys Asn Ile Thr Val Thr Ala Ser Val Asp Pro Thr Ile Asp
1 5 10 15

Leu Met Gln Ser
20

25 <210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 15

ES 2 610 395 T3

Val Glu Lys Thr Ile Ser Val Thr Ala Ser Val Asp Pro Thr Val Asp
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ser
20

<210> 16
<211> 57
<212> ADN
5 <213> *Escherichia coli*

<400> 16

tcgacaataa acaagtagag aaaaatatta ctgtaacagc tagtggtgat ccttagc 57

10 <210> 17
<211> 57
<212>ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 17

tcgagctaag gatcaacact agctgttaca gtaatatttt tctctacttg tttattg 57

15 <210> 18
<211> 20
<212> PRT
20 <213> *Escherichia coli*

<400> 18

Asp Lys Asn Pro Gly Ser Glu Asn Met Thr Asn Thr Ile Gly Pro His
1 5 10 15

Asp Arg Gly Gly
20

25 <210> 19
<211> 168
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 19

ES 2 610 395 T3

Met Leu Lys Ile Lys Tyr Leu Leu Ile Gly Leu Ser Leu Ser Ala Met
 1 5 10 15

Ser Ser Tyr Ser Leu Ala Ala Ala Gly Pro Thr Leu Thr Lys Glu Leu
 20 25 30

Ala Leu Asn Val Leu Ser Pro Ala Ala Leu Asp Ala Thr Trp Ala Pro
 35 40 45

Gln Asp Asn Leu Thr Leu Ser Asn Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Val

50

55

60

Gly Val Leu Thr Leu Ser Asn Thr Ser Ile Asp Thr Val Ser Ile Ala
 65 70 75 80

Ser Thr Asn Val Ser Asp Thr Ser Lys Asn Gly Thr Val Thr Phe Ala
 85 90 95

His Glu Thr Asn Asn Ser Ala Ser Phe Ala Thr Thr Ile Ser Thr Asp
 100 105 110

Asn Ala Asn Ile Thr Leu Asp Lys Asn Ala Gly Asn Thr Ile Val Lys
 115 120 125

Thr Thr Asn Gly Ser Gln Leu Pro Thr Asn Leu Pro Leu Lys Phe Ile
 130 135 140

Thr Thr Glu Gly Asn Glu His Leu Val Ser Gly Asn Tyr Arg Ala Asn
 145 150 155 160

Ile Thr Ile Thr Ser Thr Ile Lys
 165

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 20

Ala Ala Gly Pro Thr Leu Thr Lys Glu Leu Ala Leu Asn Val Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 21

10 <211> 190

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 21

ES 2 610 395 T3

Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
 1 5 10 15

Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met Ala Ala Gly Pro Thr Leu Thr Lys
 20 25 30

Glu Leu Ala Leu Asn Val Leu Ser Pro Ala Ala Leu Asp Ala Thr Trp
 35 40 45

Ala Pro Gln Asp Asn Leu Thr Leu Ser Asn Thr Gly Val Ser Asn Thr
 50 55 60

Leu Val Gly Val Leu Thr Leu Ser Asn Thr Ser Ile Asp Thr Val Ser
 65 70 75 80

Ile Ala Ser Thr Asn Val Ser Asp Thr Ser Lys Asn Gly Thr Val Thr
 85 90 95

Phe Ala His Glu Thr Asn Asn Ser Ala Ser Phe Ala Thr Thr Ile Ser
 100 105 110

Thr Asp Asn Ala Asn Ile Thr Leu Asp Lys Asn Ala Gly Asn Thr Ile
 115 120 125

Val Lys Thr Thr Asn Gly Ser Gln Leu Pro Thr Asn Leu Pro Leu Lys
 130 135 140

Phe Ile Thr Thr Glu Gly Asn Glu His Leu Val Ser Gly Asn Tyr Arg
 145 150 155 160

Ala Asn Ile Thr Ile Thr Ser Thr Ile Lys Asp Asn Lys Gln Ala Ala
 165 170 175

Gly Pro Thr Leu Thr Lys Glu Leu Ala Leu Asn Val Leu Ser
 180 185 190

<210> 22
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 22

ES 2 610 395 T3

Met Ala Ala Gly Pro Thr Leu Thr Lys Glu Leu Ala Leu Asn Val Leu
 1 5 10 15

Ser Pro Ala Ala Leu Asp Ala Thr Trp Ala Pro Gln Asp Asn Leu Thr
 20 25 30

Leu Ser Asn Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Val Gly Val Leu Thr Leu
 35 40 45

Ser Asn Thr Ser Ile Asp Thr Val Ser Ile Ala Ser Thr Asn Val Ser
 50 55 60

Asp Thr Ser Lys Asn Gly Thr Val Thr Phe Ala His Glu Thr Asn Asn
 65 70 75 80

Ser Ala Ser Phe Ala Thr Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ala Asn Ile Thr
 85 90 95

Leu Asp Lys Asn Ala Gly Asn Thr Ile Val Lys Thr Thr Asn Gly Ser
 100 105 110

Gln Leu Pro Thr Asn Leu Pro Leu Lys Phe Ile Thr Thr Glu Gly Asn
 115 120 125

Glu His Leu Val Ser Gly Asn Tyr Arg Ala Asn Ile Thr Ile Thr Ser
 130 135 140

Thr Ile Lys Asp Asn Lys Gln Ala Ala Gly Pro Thr Leu Thr Lys Glu
 145 150 155 160

Leu Ala Leu Asn Val Leu Ser Leu Glu His His His His His His
 165 170 175

<210> 23

<211> 146

<212> PRT

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 23

ES 2 610 395 T3

Ala Ala Gly Pro Thr Leu Thr Lys Glu Leu Ala Leu Asn Val Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Ala Ala Leu Asp Ala Thr Trp Ala Pro Gln Asp Asn Leu Thr Leu
 20 25 30

Ser Asn Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Val Gly Val Leu Thr Leu Ser
 35 40 45

Asn Thr Ser Ile Asp Thr Val Ser Ile Ala Ser Thr Asn Val Ser Asp
 50 55 60

Thr Ser Lys Asn Gly Thr Val Thr Phe Ala His Glu Thr Asn Asn Ser
 65 70 75 80

Ala Ser Phe Ala Thr Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ala Asn Ile Thr Leu
 85 90 95

Asp Lys Asn Ala Gly Asn Thr Ile Val Lys Thr Thr Asn Gly Ser Gln
 100 105 110

Leu Pro Thr Asn Leu Pro Leu Lys Phe Ile Thr Thr Glu Gly Asn Glu
 115 120 125

His Leu Val Ser Gly Asn Tyr Arg Ala Asn Ile Thr Ile Thr Ser Thr
 130 135 140

Ile Lys
 145

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunogénica, caracterizada porque dicha composición es un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos que codifica para un polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico de adhesina de fimbria de *Escherichia coli* unido en el extremo C-terminal de dicha adhesina de fimbria a un ligador que está operativamente unido en el extremo-C terminal de dicho ligador a un polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico de subunidad de fimbria estructural principal de *Escherichia coli* que comprende al menos los 12 primeros aminoácidos del motivo de cadena beta N-terminal de dicha subunidad de fimbria estructural principal de *Escherichia coli*, que comprende una cadena donadora que complementa la adhesina de fimbria y que confiere estabilidad conformacional y resistencia a proteasas a dicho polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico de adhesina de fimbria de *Escherichia coli*, y en la que dicho polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico de adhesina de fimbria de *Escherichia coli* se selecciona del grupo que consiste en CfaE, CsfD, CsuD, CooD, CosD, CsdD, CsbD y CotD, y dicho polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico de subunidad de fimbria estructural principal de *Escherichia coli* se selecciona del grupo que consiste en CfaB, CsfA, CsuA1, CsuA2, CooA, CosA, CsbA, CsdA y CotB.
2. Composición inmunogénica según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico de adhesina de fimbria de *Escherichia coli* es un monómero o polímero de polipéptidos de adhesina.
3. Composición inmunogénica según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha adhesina de fimbrias de *Escherichia coli* completa es un polipéptido de CfaE compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4.
4. Composición inmunogénica según la reivindicación 1, caracterizada porque al menos uno de dichos fragmentos de polipéptido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14 y SEQ ID No. 15.
5. Composición inmunogénica según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha subunidad de fimbria estructural principal de fimbrias de *Escherichia coli* completa es CfaB con SEQ ID No. 5 o SEQ ID NO. 6 o un fragmento antigénico de las mismas.
6. Composición inmunogénica caracterizada porque dicha composición es un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos que codifica para un polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico de CstH de *Escherichia coli* unido en el extremo C-terminal de dicho CstH a un ligador que está operativamente unido en el extremo C-terminal de dicho ligador a un polipéptido de cadena donadora de CstH que comprende al menos los 16 primeros aminoácidos del motivo de cadena beta N-terminal de dicho CstH y que confiere estabilidad conformacional y resistencia a proteasas a dicho polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico, de CstH de *Escherichia coli*.
7. Composición inmunogénica según la reivindicación 6, caracterizada porque dicho CstH está compuesto por SEQ ID No. 23 o fragmentos de polipéptido antigénico de la misma.
8. Composición inmunogénica según la reivindicación 6, caracterizada porque dicho polipéptido duplicado de polipéptido de cadena donadora de CstH es la región N-terminal de CstH compuesta por la secuencia SEQ ID No. 20.
9. Composición inmunogénica según la reivindicación 6, caracterizada porque dicho complejo que comprende una secuencia de aminoácidos es SEQ ID No. 21 ó 22.
10. Composición inmunogénica según la reivindicación 1 ó 6, caracterizada porque dicho ligador está compuesto por la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 o SEQ ID No. 3 o fragmentos operativos de las mismas.
11. Uso de la composición inmunogénica según la reivindicación 1 ó 6 para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria, caracterizado porque el medicamento es para:
 - a. administración de dicha composición inmunogénica en un intervalo de dosis unitaria de 50 µg a 1 mg;
 - b. administración de una dosis de refuerzo de dicha composición inmunogénica al menos 1 semana después de la dosis de sensibilización con un intervalo de dosis unitaria de 50 µg a 1 mg de inmunógeno en disolución acuosa tamponada.
12. Uso según la reivindicación 11, caracterizado porque dicho medicamento es para la inducción de la

producción de moléculas de inmunoglobulina que pueden unirse a un polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico de fimbrias de *Escherichia coli*.

- 5 13. Uso según la reivindicación 11, caracterizado porque dicha respuesta inmunitaria inhibe la adherencia de fibrillas o fimbrias de *Escherichia coli* a células humanas.
14. Uso según la reivindicación 11, caracterizado porque dicho polipéptido antigénico completo o fragmento de polipéptido antigénico de fibrillas de *Escherichia coli* es el antígeno de superficie de coli 3.
- 10 15. Uso según la reivindicación 11, caracterizado porque dicho medicamento es para inhibir la adherencia de bacterias diarreogénicas a células humanas.
16. Uso según la reivindicación 11, caracterizado porque dicho medicamento es para reducir la colonización de bacterias diarreogénicas.
- 15 17. Uso de un inmunógeno que contiene una célula bacteriana huésped que contiene la composición inmunogénica según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria, caracterizado porque el medicamento es para:
- 20 a. administración de una dosis de sensibilización de dichos inmunógenos de tal manera que se administren números adecuados de células bacterianas huésped de manera que el polipéptido de adhesina recombinante expresado de dicha composición inmunogénica sea de 50 µg a 1 mg por dosis; y
- 25 b. administración de 1 a 4 dosis de refuerzo de dicha célula bacteriana huésped que contiene dicha composición inmunogénica según la reivindicación 1 con la primera dosis de refuerzo al menos 1 semana después de la dosis de sensibilización de dicho inmunógeno de tal manera que el inmunógeno se administra en números adecuados de células bacterianas huésped por dosis de manera que el polipéptido de adhesina recombinante expresado de dicha composición inmunogénica sea de 50 µg a 1 mg por dosis.
- 30 18. Uso de un inmunógeno que contiene una célula bacteriana huésped que contiene la composición inmunogénica según la reivindicación 6 para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria, caracterizado porque el medicamento es para:
- 35 a. administración de una dosis de sensibilización de dicho inmunógeno de tal manera que se administren números adecuados de células bacterianas huésped de manera que el polipéptido de adhesina recombinante expresado de dicha composición inmunogénica sea de 50 µg a 1 mg por dosis; y
- 40 b. administración de 1 a 4 dosis de refuerzo de dicha célula bacteriana huésped que contiene dicha composición inmunogénica según la reivindicación 1 con la primera dosis de refuerzo al menos 1 semana después de la dosis de sensibilización de dicho inmunógeno de tal manera que el inmunógeno se administra en números adecuados de células bacterianas huésped por dosis de manera que el polipéptido de adhesina recombinante expresado de dicha composición inmunogénica sea de 50 µg a 1 mg por dosis.
- 45 19. Uso según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque dicha célula bacteriana huésped es una bacteria atenuada viva o muerta.
- 50 20. Uso según una de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizado porque dicha célula bacteriana huésped se selecciona del grupo que consiste en *Escherichia coli*, miembro del género *Shigella*, miembro del género *Campylobacter*, miembro del género *Salmonella*, miembro del género *Vibrio*.
- 55 21. Uso según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque el medicamento es para la inducción de moléculas de inmunoglobulina que pueden unirse a dichas fimbrias de *Escherichia coli*.
22. Uso según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque el medicamento es para inhibir la adherencia de fimbrias de *Escherichia coli* a células humanas.
- 60 23. Uso según una de las reivindicaciones 13 ó 22, caracterizado porque dichas células humanas son células epiteliales mucosas.
- 65 24. Uso según la reivindicación 11, caracterizado porque el medicamento es para reducir o prevenir la diarrea en seres humanos.

25. Uso según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque el medicamento es para reducir o prevenir la diarrea en seres humanos.
- 5 26. Uso según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque dicho medicamento es para administración subcutánea, transdérmica, intramuscular, oral, transcutánea o por vía nasal.
27. Uso según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque dicho medicamento es para inhibir la colonización de *Escherichia coli* en células humanas.
- 10 28. Uso según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque dicho medicamento es para administración oral.
29. Uso según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque dicho medicamento es para prevenir la diarrea en seres humanos provocada por bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli*, miembro del género *Shigella*, miembro del género *Campylobacter*, miembro del género *Salmonella*, miembro del género *Vibrio*.
- 15 30. Composición inmunogénica según la reivindicación 1 ó 6 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra bacterias diarreogénicas.
- 20 31. Composición inmunogénica según la reivindicación 30, en la que dichas bacterias diarreogénicas son *E. coli* enterotóxica.

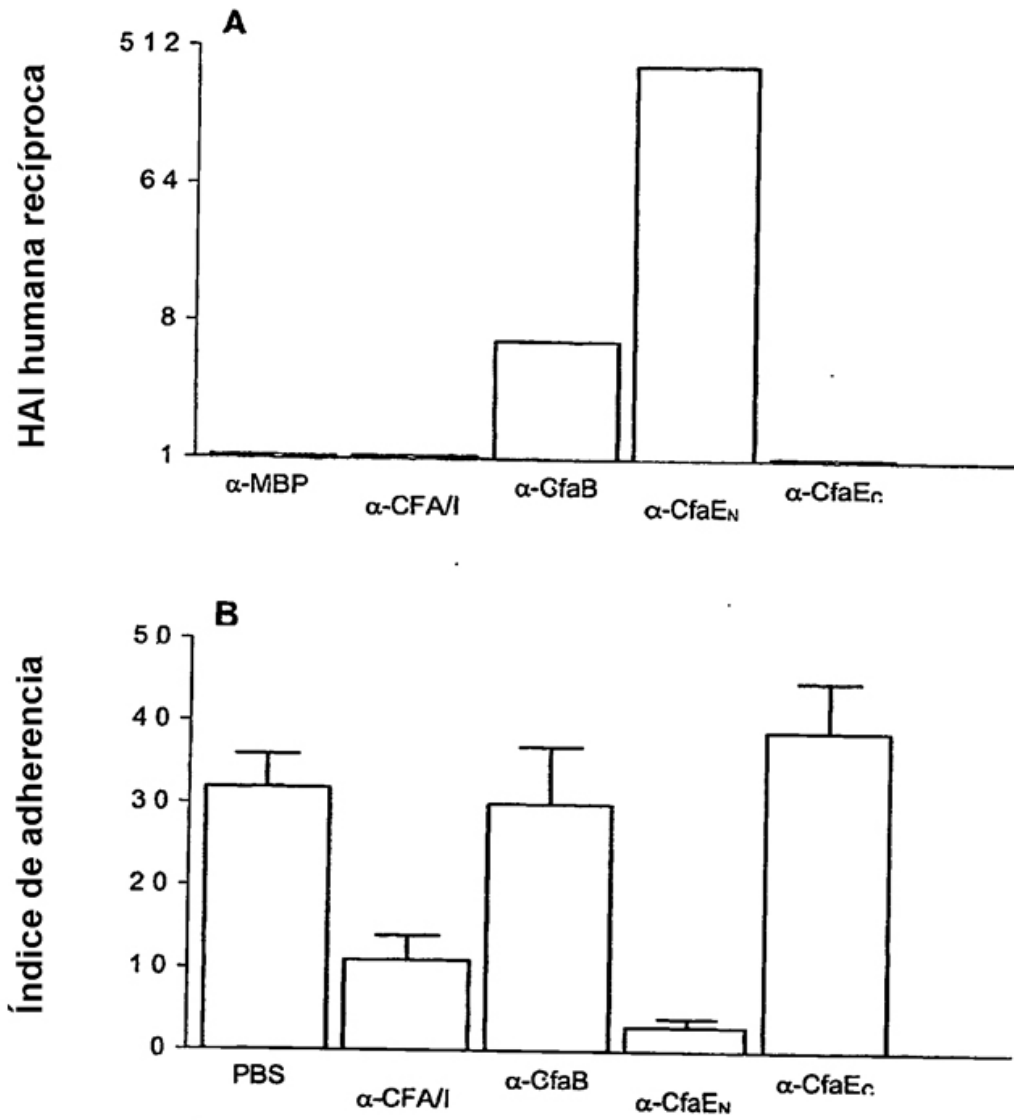


FIG 1

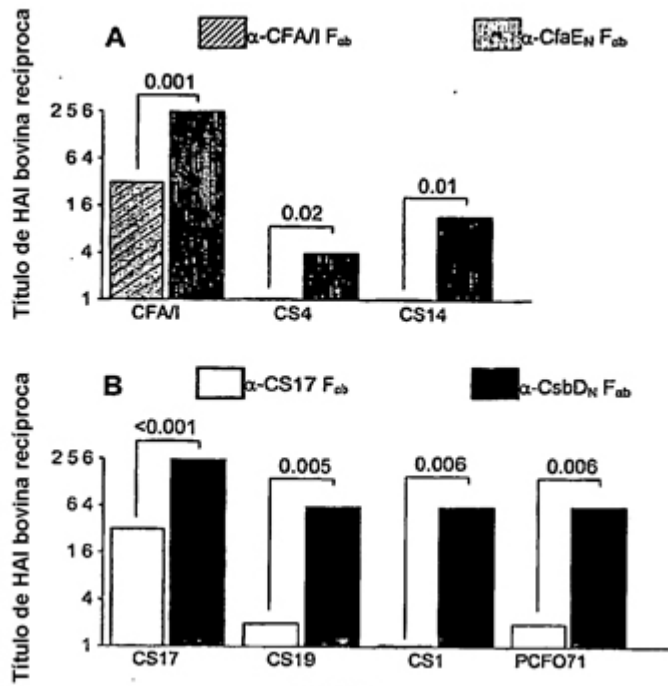


FIG 2

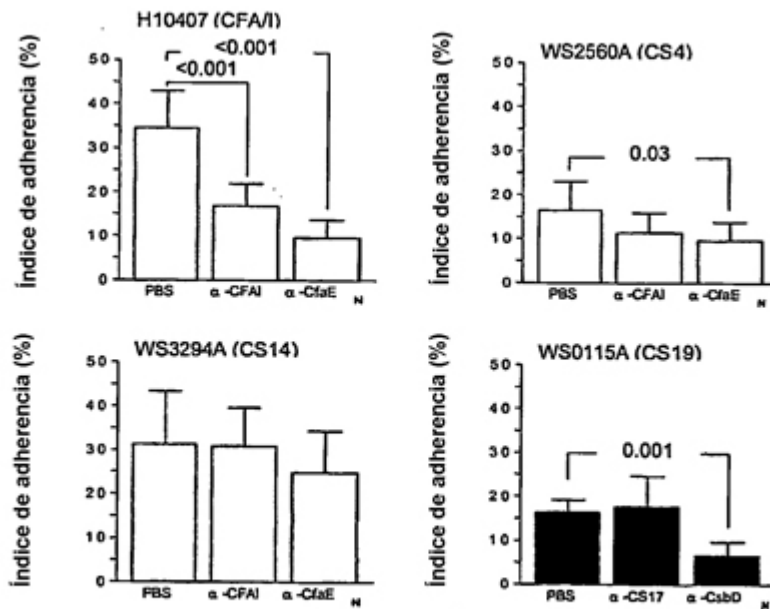


FIG 3


Subunidad principal		Fimbrias
VEKNITVTASVDPVIDLLQA	CfaB	CFA/I
VEKNITVTASVDPTIDILQA	CsfA	CS4
VEKNITVTASVDPTIDILQA	CsuA1	CS14
VEKNITVTASVDPTIDILQA	CsuA2	CS14
VEKTISVTASVDPTVDLLQS	CooA	CS1
VEKTISVTASVDPTVDLLQS	CosA	PCF071
VEKNITVRASVDPKLDLLQA	CsbA	CS17
VEKNITVRASVDPKLDLLQA	CsdA	CS19
AEKNITVTASVDPTIDLMS	CotA	CS2
VQKDITVTANVDTTLEMLSA	CblA	Bcep
VQKDITVTANIDSTLELLQA	TsaB	Styp
		
UZKxUTUxAxUDxxUDUUxx		

FIG 4

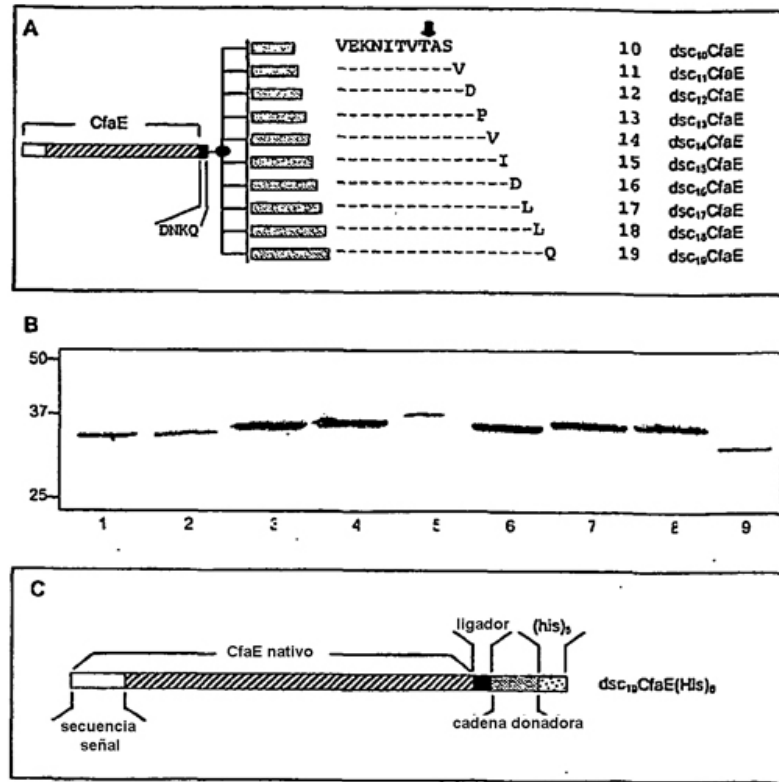


FIG 5

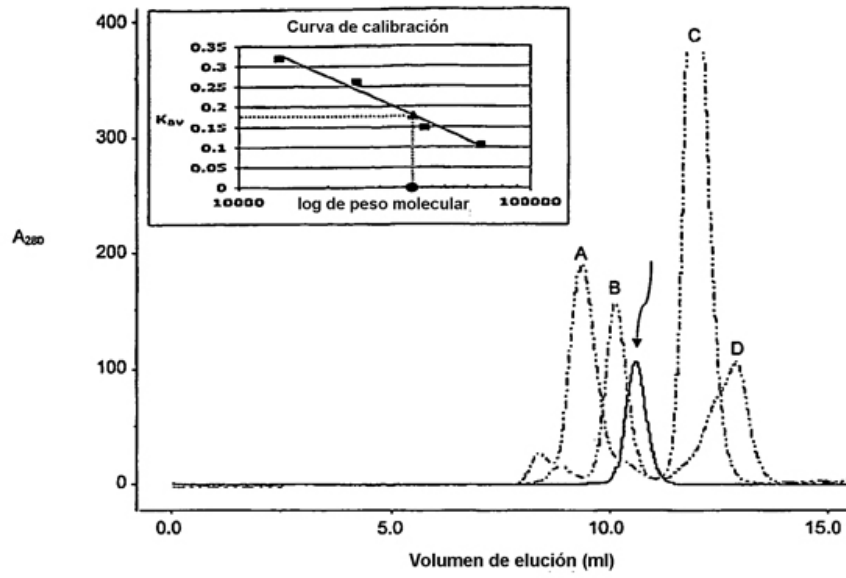


FIG 6

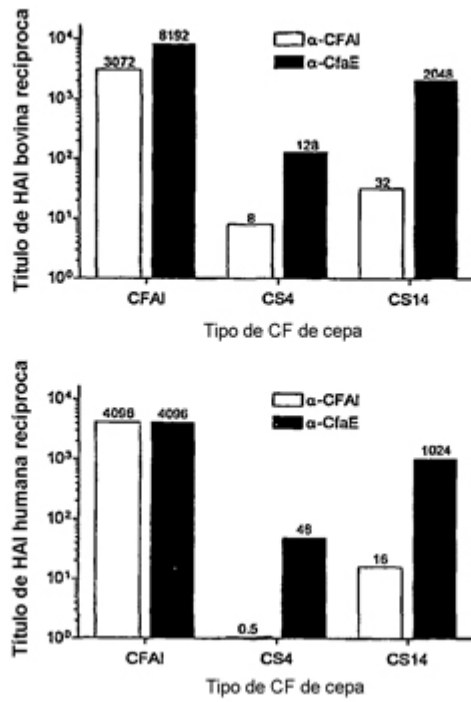


FIG 7

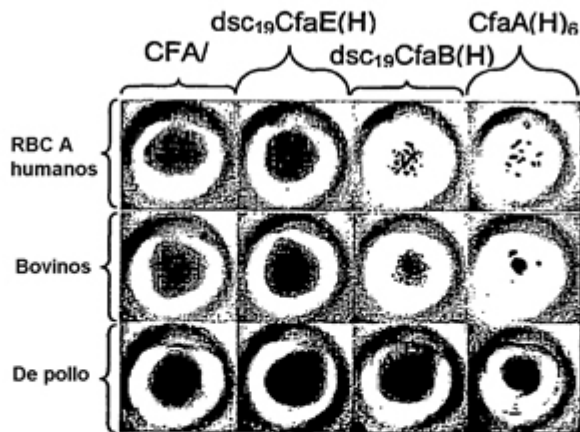


FIG 8

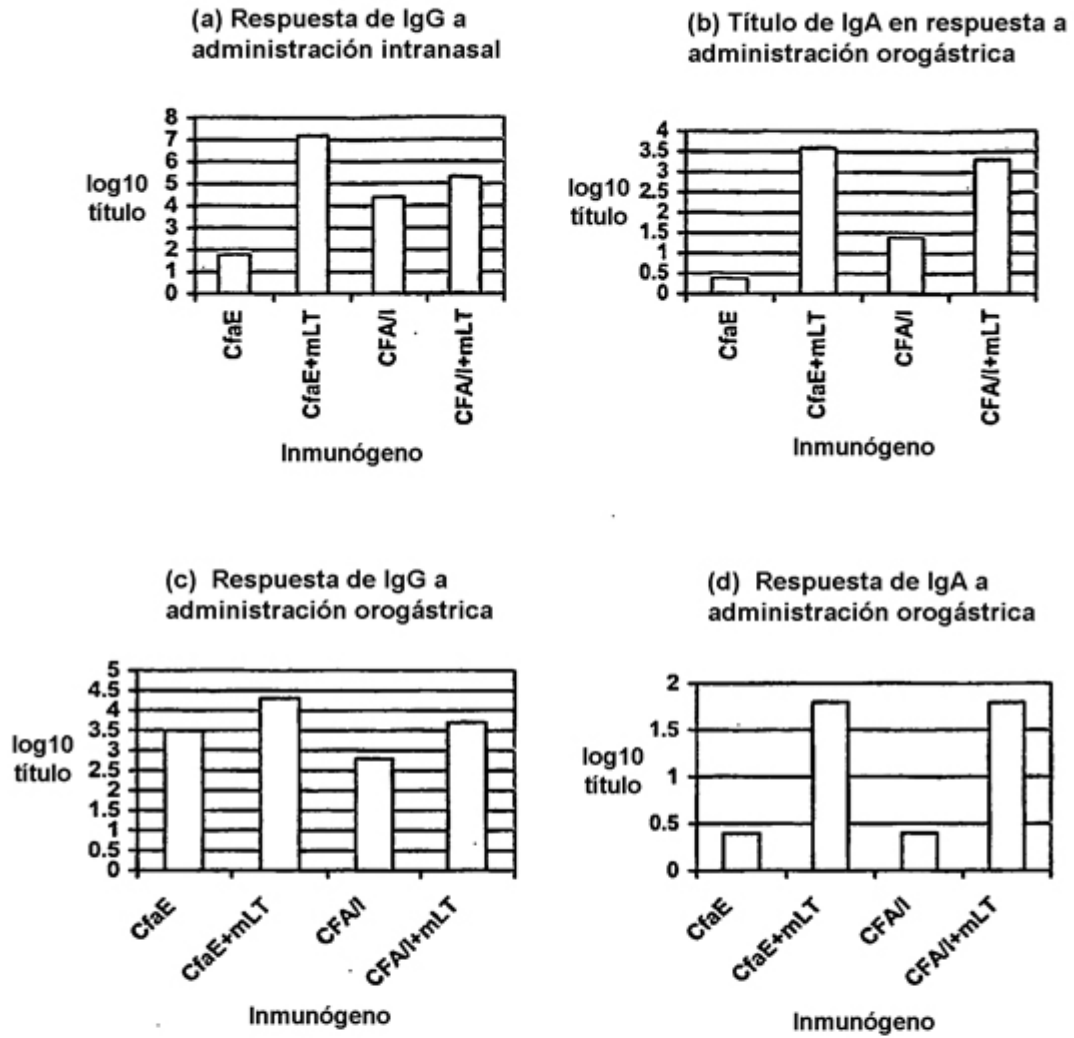


FIG 9

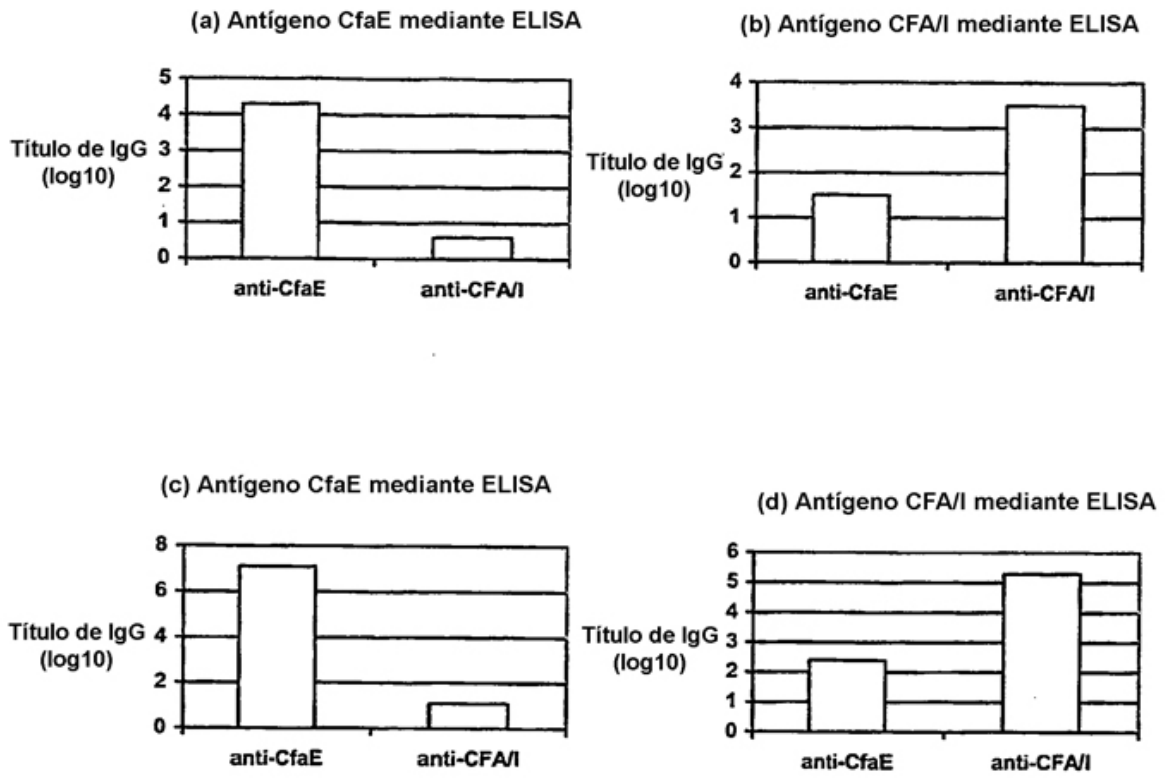


FIG 10

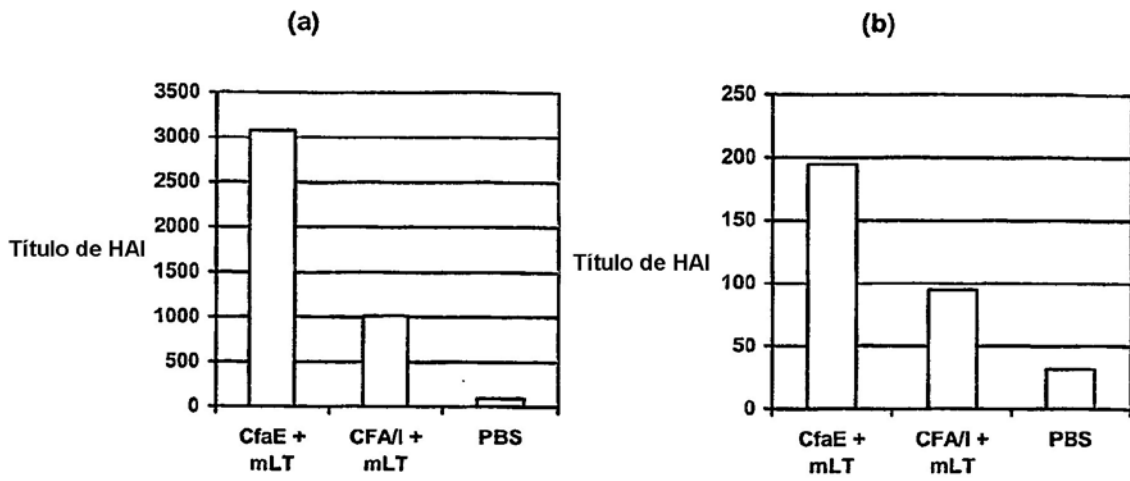


FIG 11

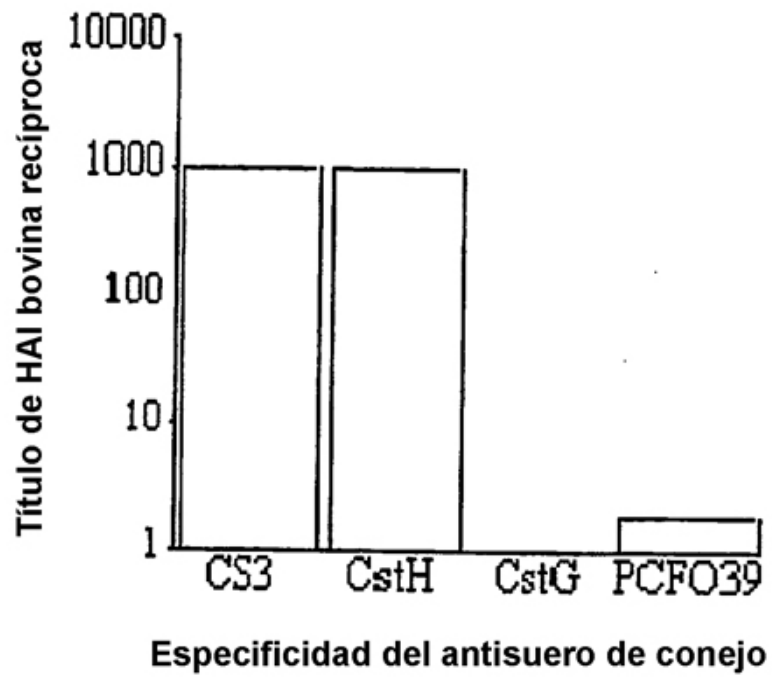


FIG 12

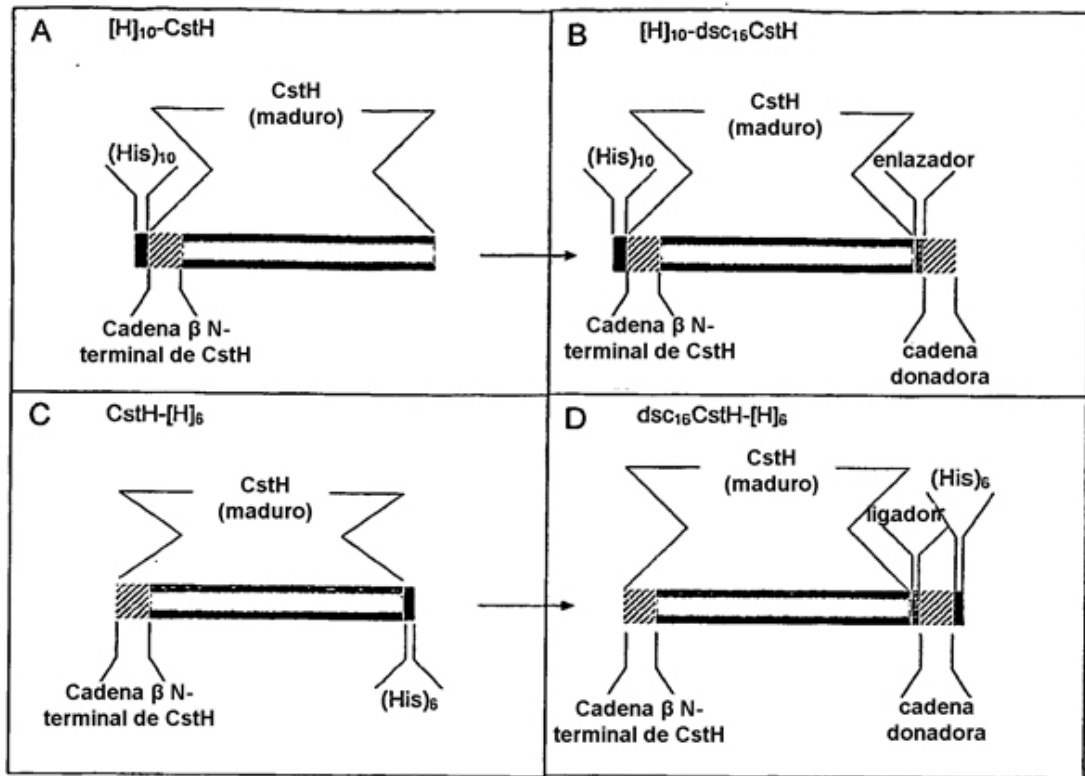


FIG 13

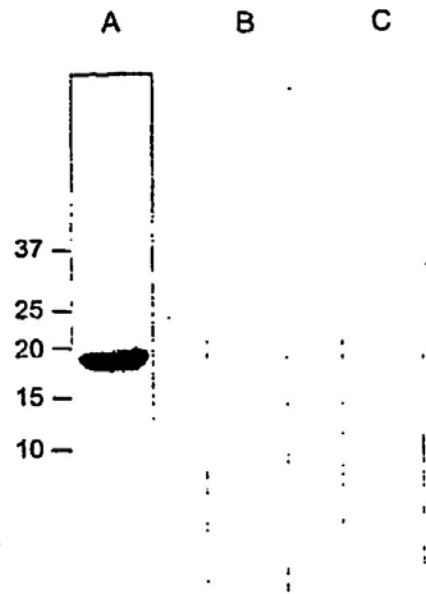


FIG 14