

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 803**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2010 PCT/US2010/021610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.07.2010 WO2010085539**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2010 E 10733840 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2381954**

54 Título: **Métodos y composiciones basadas en proteína tipo 2 de la toxina Shiga**

30 Prioridad:

**23.01.2009 US 146892 P**  
**13.03.2009 US 210082 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**O'BRIEN, ALISON;**  
**MELTON-CELSA, ANGELA;**  
**SMITH, MICHAEL y**  
**SINCLAIR, JAMES**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 614 803 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

Métodos y composiciones basadas en proteína tipo 2 de la toxina Shiga

**Antecedentes de la invención**

En general, la invención se refiere al campo del tratamiento y la prevención de enfermedades asociadas a la toxina Shiga.

En los Estados Unidos, la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (Stx) (ECTS) representa aproximadamente 110.000 infecciones por año. La *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), más en particular el serotipo O157:H7, es un subconjunto de ECTS que se observa que produce enfermedad mediada por Stx. Una posible complicación de una infección con un organismo productor de Stx es el síndrome urémico hemolítico (SUH), que se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia trómbica e insuficiencia renal. Hay aproximadamente una tasa de mortalidad del 5-10 % para aquellos con SUH y los supervivientes pueden tener daño renal duradero. Actualmente no hay terapias autorizadas por la FDA o vacunas para combatir o prevenir la enfermedad de una enfermedad mediada por Stx, pero varias opciones prometedoras para el futuro incluyen: un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a y neutraliza Stx2 y un toxoide quimérico StxA2/StxB1 que provoca una respuesta neutralizante y proporciona protección contra una exposición letal de Stx1 o Stx2 o Stx1 y Stx2.

Esencialmente hay dos tipos principales de Stx: Stx/Stx1 y Stx2. Stx se produce de *Shigella dysenteriae* tipo 1, mientras que Stx1 y Stx2 se producen de *Escherichia coli*. Stx y Stx1 son prácticamente idénticas, con solo una diferencia de aminoácidos en la subunidad A. Las subunidades A y B maduras de Stx1 y Stx2 tienen 68 y 73 % de similitud, respectivamente. A pesar de las diferencias de las secuencias de aminoácidos, las estructuras cristalinas de Stx y Stx2 son sorprendentemente similares (Figura 1). Estas toxinas pueden diferenciarse por antisueros policlonales: antisueros policlonales producidos contra Stx1 no neutralizan Stx2 y viceversa. Variantes de Stx1 y Stx2 existen e incluyen Stx1c, Stx1d, Stx2c, Stx2d, Stx2d-activable (Stx2-act.), Stx2e y Stx2f.

Las toxinas Shiga son holotoxinas complejas con una estructura AB<sub>5</sub>. El dominio activo (A) contiene una N-glicosidasa que depurina el ARNr 28S de la subunidad ribosómica 60S, que detiene la síntesis de proteínas y con el tiempo conduce a muerte celular. La subunidad A tiene ~ 32 kDa y se escinde proteolíticamente por tripsina o furina en una unidad A<sub>1</sub> de ~ 28 kDa y un péptido A<sub>2</sub> de ~ 5 kDa que están conectados mediante un único enlace disulfuro. La subunidad A<sub>1</sub> contiene el dominio activo, y el péptido A<sub>2</sub> une no covalentemente el dominio activo con el dominio de unión (B). El dominio (B) consiste en cinco monómeros de ~ 7,7 kDa idénticos que forman un pentámero a través del cual atraviesa el extremo C del péptido A<sub>2</sub>. Cada uno de los monómeros de la subunidad B tiene dos restos de cisteína que forman un enlace disulfuro dentro de cada monómero. El pentámero B se une al receptor eucariota globotriaosil ceramida (Gb<sub>3</sub>) (o Gb<sub>4</sub> como es el caso para Stx2e).

A pesar de los resultados conocidos de exposición a estas toxinas, actualmente no hay cura conocida o vacuna para enfermedades mediadas por Stx. El uso de antibióticos puede agravar la situación, aumentando la liberación de toxinas de la bacteria. Así, existe la necesidad de un compuesto que prevenga o trate las complicaciones de la infección por ECEH producida por toxina Shiga. Un compuesto tal podría usarse para tratar sujetos infectados y disminuir los efectos sistémicos de la toxina sobre el SNC, sangre y riñones. Además, si la toxina pudiera neutralizarse, podrían administrarse de forma segura antibióticos para destruir las bacterias en el tubo GI. El tratamiento con antibióticos para infección por ECTS está contraindicado debido a las posibilidades de que el antibiótico aumente la producción de toxina, induciendo al fago que lleva al gen de la toxina. Un compuesto tal también podría usarse para prevenir complicaciones de la infección tratando individuos expuestos o en alto riesgo antes de que adquieran la infección por ECEH. Tales individuos incluirían niños en la guardería o ancianos en residencias de ancianos, donde se ha identificado un caso de diarrea por ECEH. Estos individuos tienen un riesgo elevado de desarrollar infección por ECEH, frecuentemente con complicaciones graves, y la propagación de ECEH en estos entornos no es poco usual.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

El anticuerpo monoclonal 11E10 reconoce la subunidad A de Stx2 y neutraliza su citotoxicidad. A pesar del 68 % de similitud de secuencia de aminoácido (aa) entre StxA1 y StxA2, el anticuerpo monoclonal 11E10 no se unen a StxA1. Los presentes inventores han descubierto que el epítipo 11E10 engloba un epítipo discontinuo, o conformacional, que abarca tres regiones en el monómero StxA2. Se encuentra que las tres regiones de disimilitud, que incluyen los aa 42-49 (SEQ ID NO: 1), 96-100 (SEQ ID NO: 2) y 244-259 (SEQ ID NO: 3), están localizadas las unas cerca de las otras en el cristal.

Por consiguiente, la invención caracteriza un polipéptido que incluye al menos la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1. Deseablemente, el polipéptido incluye las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 1 y 2 o, más deseablemente SEQ ID NOs: 1, 2 y 3. Las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3 se insertan en un armazón de proteína no Stx2 sustancialmente idéntico a Stx1 o un fragmento del mismo, por ejemplo, al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % idéntico. En una realización, el armazón de proteína es Stx1 que lleva una o más mutaciones puntuales conservativas. El polipéptido de la invención incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos

expuesta en SEQ ID NO: 8. En otra realización más, el polipéptido puede incluir fragmentos de Stx2 que incluyen SEQ ID NOs: 1, 2, o 3; SEQ ID NOs: 1 y 2; o SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, por ejemplo, los aminoácidos 29-297, aminoácidos 1-158, o aminoácidos 29-128 de la secuencia de polipéptidos de Stx2, en la que el fragmento no es Stx2 de longitud completa. En algunas realizaciones, el fragmento se inserta en un armazón de proteína, por ejemplo, Stx o Stx1.

La invención también caracteriza un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a un fragmento de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8. En una realización, el fragmento incluye una secuencia al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % idéntica a los aminoácidos 64-122 de SEQ ID NO: 8 y además incluye al menos la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1. Preferentemente, el fragmento comprende además la(s) secuencia(s) de aminoácidos expuesta(s) en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NOS: 2 y 3. El fragmento puede ser, por ejemplo, 20, 40, 59, 60, 150, 200, 219, 236, 250, 300 o 314 aminoácidos de longitud. En ciertas realizaciones, el polipéptido está convertido en toxoide. Todos los polipéptidos citados anteriormente están englobados dentro del término "polipéptidos de la invención".

La invención también incluye moléculas de ácidos nucleicos, que incluyen donde el ácido nucleico se une a una construcción de expresión en un vector y donde este vector se inserta en una célula huésped, que codifica cualquiera de los polipéptidos de la invención.

En un aspecto relacionado, la invención caracteriza una composición para estimular una respuesta inmunitaria contra Stx2 usando uno cualquiera de los polipéptidos de la invención.

Deseablemente, el polipéptido incluye las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 1 y 2 o, más deseablemente, 1, 2 y 3. En cualquiera de estas realizaciones, la composición puede incluir además un adyuvante. En ciertas realizaciones, la composición no estimula una respuesta inmunitaria contra Stx1.

La invención también caracteriza el uso de cualquiera de los polipéptidos de la invención (por ejemplo, un armazón de proteína tal como Stx1 en el que se insertan las secuencias de aminoácidos expuestas en al menos una, dos, o las tres SEQ ID NOs: 1, 2, o 3). Tales péptidos pueden ser útiles para inmunización contra o tratamiento de cualquier enfermedad asociada a toxina Shiga que incluye síndrome urémico hemolítico y enfermedades asociadas a *E. coli* e infección por *S. dysenteriae*. El péptido tiene al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la invención caracteriza un método de producción de un anticuerpo anti-Stx2 (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales) o fragmento del mismo que se une específicamente al epítipo 11E10 de Stx2. Tales anticuerpos o fragmentos se unen específicamente a Stx2 y no a Stx1. Este método incluye la inmunización de un mamífero con un polipéptido que incluye un fragmento de Stx2 (es decir, Stx2 no de longitud completa) que incluye al menos una, dos o tres de las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, donde este polipéptido no incluye Stx2 de longitud completa. Preferentemente el método incluye el uso de un polipéptido que contiene al menos la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, más preferentemente las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 1 y 2, e incluso más preferentemente las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3. El péptido incluye un armazón de proteína, por ejemplo una proteína sustancialmente idéntica a Stx1, en la que se insertan una o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3. El método puede incluir inmunización del mamífero con un polipéptido que contiene el epítipo 11E10, por ejemplo como se describe en el presente documento, donde el polipéptido no incluye Stx2 de longitud completa. En una realización, un mamífero se inmuniza con un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8. Los anticuerpos anti-Stx2 producidos por los métodos anteriores pueden cribarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica o descritos en el presente documento que incluyen, por ejemplo, el ensayo de neutralización *in vitro*, para identificar anticuerpos que se unen específicamente a Stx2 y no a Stx1. El polipéptido inmunogénico y los métodos de preparación de este polipéptido, junto con la molécula de ácido nucleico que codifica este polipéptido (incluyendo donde este ácido nucleico está unido a una construcción de expresión en un vector, y donde este vector se inserta en una célula huésped), también están incluidos como aspectos relacionados de la invención.

La invención también caracteriza anticuerpos anti-Stx2 o fragmentos de los mismos que se unen específicamente al epítipo 11E10 de Stx2, donde los anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen específicamente a Stx2 y no a Stx1. Anticuerpos preferidos de la invención se unen a un epítipo que incluye al menos una, dos o las tres secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, que incluyen al menos SEQ ID NO: 1, más deseablemente que incluyen al menos SEQ ID NOs: 1 y 2, y lo más deseable que contienen SEQ ID NOs: 1, 2 y 3. El epítipo del anticuerpo puede ser un epítipo conformacional donde las secuencias de aminoácidos están en proximidad basándose en la conformación del armazón de proteína, por ejemplo, como en las proteínas quiméricas descritas en el presente documento, donde una o más de las secuencias de Stx2 expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3 se insertan en un armazón de proteína sustancialmente idéntico a Stx1. Los anticuerpos pueden ser IgG, IgM, IgE, IgD, IgA, Fab, Fv, anticuerpos monoclonales y policlonales, o fragmentos de anticuerpos y pueden desarrollarse por los métodos descritos en el presente documento. Los anticuerpos se unen preferentemente a Stx2 con una  $K_d$  inferior a 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM o 1 pM o menos. En un ejemplo, el anticuerpo de la invención inhibe la unión del anticuerpo 11E10 a Stx2 o a una proteína quimérica que contiene el epítipo 11E10, que incluye una inhibición con un valor de  $K_d$  de entre 100 nM y 1 pM. Un anticuerpo de la invención puede inhibir Stx2 uniéndose al receptor eucariota globotriaosil ceramida (Gb3). Los anticuerpos anti-Stx2 de la invención excluyen específicamente

cualquier forma de ratón, humanizada o quimérica de los siguientes anticuerpos 11E10, TMA-15, VTM1.1, 5C12 (incluyendo el anticuerpo monoclonal humano 5C12 y r5C12), 6G3, 5H8, 11F11, 11G10, 2E1, 10E10, IG3, 2F10, 3E9, 4H9, 5A4, 5F3, 5C11, 1A4, 1A5, BC5 BB12, DC1 EH5, EA5 BA3, ED5 DF3, GB6, BA4 y anticuerpos  $\alpha$ Stx2. La invención incluye además una línea celular de hibridoma que produce cualquiera de los anticuerpos de la invención.

- 5 Otro aspecto más de la invención caracteriza un método de detección Stx2 en una muestra biológica (por ejemplo, tejido, célula, extracto de células, fluido corporal y muestra de biopsia) usando cualquiera de los anticuerpos anti-Stx2 de la invención. Métodos de detección de la invención incluyen sin limitación ELISA, RIA, transferencia Western, inmunoprecipitación y citometría de flujo. La invención incluye el diagnóstico de una enfermedad asociada a toxina Shiga basándose en la identificación de Stx2 en una muestra. La invención también caracteriza un kit de prueba inmunológica para detectar una enfermedad asociada a toxina Shiga, incluyendo el kit un anticuerpo de la invención y un medio de detección de una interacción entre el anticuerpo y Stx2 presente en la muestra.

- 10 Otro aspecto más de la invención caracteriza un método de tratamiento de una enfermedad asociada a toxina Shiga usando un anticuerpo como se proporciona en el presente documento o como se produce por cualquiera de los métodos anteriores. Ejemplos de enfermedades asociadas a toxina Shiga incluyen síndrome urémico hemolítico (SUH) y enfermedades asociadas a *E. coli* e infección por *S. dysenteriae*. Estos anticuerpos pueden administrarse en combinación con otras terapias, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen específicamente a otras proteínas asociadas a toxina Shiga (por ejemplo, Stx1).

- 15 Por "epítotope 11E10" se indica una secuencia de aminoácidos que, bien como resultado de la estructura lineal como de la conformación tridimensional, forma el sitio de unión para el anticuerpo 11E10. Este término puede incluir cualquier proteína Stx2 no de longitud completa que incluye secuencias idénticas a o sustancialmente idénticas a una, dos o tres de las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3 (por ejemplo, SEQ ID NOs: 1 y 2 o SEQ ID NOs: 1, 2 y 3). En realizaciones deseadas, el epítotope 11E10 incluye SEQ ID NOs: 1 y 2 o 1, 2 y 3. Un ejemplo de una proteína que incluye un epítotope 11E10 es una proteína que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8.

- 20 Por los términos "anticuerpo que se une específicamente al epítotope 11E10 de Stx2" o "anticuerpo específico del epítotope 11E10" se indica un anticuerpo que se une con un valor de  $K_d$  de entre 100 nM-1 pM a una proteína que incluye el epítotope 11E10. Tales anticuerpos también se caracterizan por poca o ninguna unión detectable a la proteína Stx1 (por ejemplo, que tiene un valor de  $K_d$  superior a 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM o mayor para Stx1). Las afinidades del anticuerpo pueden determinarse usando cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, ensayo basado en resonancia de plasmones superficiales, ensayo de inmunoadsorción de enzimas (ELISA) y ensayos de competición (por ejemplo, RIA). Por tanto, el anticuerpo puede someterse a un ensayo de neutralización *in vitro* como se describe en el presente documento. Un anticuerpo que se une específicamente al epítotope 11E10 puede neutralizar el efecto citotóxico de Stx2 al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, o más, usando los ensayos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. El término excluye específicamente las siguientes formas de ratón, quiméricas, humanizadas o humanas de los siguientes anticuerpos anti-Stx2: 11E10, TMA-15, VTM1.1, 5C12 (incluyendo anticuerpo monoclonal humano 5C12 y r5C12 (Akiyoshi y Tzipori (2005) Infect. Immun. 73:4054-4061), 6G3, 5H8, 11F11, 11G10, 2E1, 10E10 (Perera et al. (1988) J. Clin. Microbiol. 26:2127-2131), IG3, 2F10, 3E9, 4H9, 5A4, 5F3, 5C11, 1A4, 1A5 (Ma et al. (2008) Immunol. Lett. 121:110-115 (2008), BC5 BB12, DC1 EH5, EA5 BA3, ED5 DF3, GB6, BA4 (Downes et al. (1988) Infect. Immun. 56:1926-1933), anticuerpos  $\alpha$ Stx2, anticuerpos descritos en Smith et al. ((2006) Vaccine 24:4122-4129), anticuerpos descritos en Donohue-Rolfe et al. ((1999) Infect Immun. 67:3645-364) y anticuerpos descritos en Sheoran et al. ((2003) Infect Immun. 71:3125-3130).

- 25 Por "inhiben la unión" se indica que produce una disminución en una proteína que se une a otra proteína al menos el 50 %, preferentemente el 60 %, 70 %, 80 %, el 90 %, o más, como se mide, por ejemplo, por transferencia Western como se describe en el presente documento o por ELISA o los ensayos de unión al receptor de Gb<sub>3</sub> conocidos en la técnica.

- 30 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), o fragmentos de anticuerpos, siempre que tales moléculas posean una actividad biológica deseada (por ejemplo, neutralización de la toxina Stx2 como se describe en el presente documento).

- 35 Como se usa en el presente documento, "purificada" o "aislada" se refiere a una proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos.

- 40 Por "convertido en toxoide" se indica alterado, por ejemplo, por mutación, conjugación o reticulación, de un modo que disminuya la citotoxicidad mientras que se mantiene la antigenicidad.

Versiones convertidas en toxoide de Stx2 incluyen Stx2 tratado con formaldehído y glutaraldehído y Stx2 con una mutación Y77S. Otros ejemplos no limitantes de proteínas Stx convertidas en toxoide son Stx2 que lleva mutaciones

Y77S y E167Q (Wen et al. (2006) *Vaccine* 24: 1142-1148), Stx2 que lleva una marca E167D y 6 histidina (Robinson et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:9667-9672), toxoide StxA2/StxB1 que lleva mutaciones Y77S, E167Q y R170L (Smith et al, *Vaccine* 24:4122-4129 (2006)). Otros ejemplos se describen en Gordon et al. ((1992) *Infect. Immunol.* 60(2):485-490).

- 5 Por "Stx2 no de longitud completa" se indica una proteína que contiene menos del 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, o menos aminoácidos del polipéptido de Stx2 de longitud completa. Ejemplos de Stx2 no de longitud completa incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 4-8. Otros ejemplos incluyen polipéptidos que incluyen o consisten en los aminoácidos 29-297, 1-158 o 29-128 de Stx2, que incluyen, por ejemplo, los polipéptidos quiméricos proporcionados en la Figura 1A. La subunidad A para Stx1 no mutante, Stx2 o las toxinas quiméricas descritas dentro de la presente solicitud tienen todas una secuencia conductora de 22 aminoácidos que se elimina, generando así la proteína de subunidad A madura.

10 Para los fines de esta memoria descriptiva, el término "Stx2 de longitud completa" y la numeración de aminoácidos de fragmentos de Stx2 se refieren a la subunidad StxA2 madura de longitud completa. Esta subunidad A madura se escinde después asimétricamente por tripsina o furina en un fragmento A1 (extremo N ~ 248 aminoácidos) y un péptido A2 (extremo C ~ 50 aa). La subunidad A, tanto en forma nativa como quimérica, está normalmente presente en el contexto de la holotoxina; sin embargo, expresada sola (por ejemplo, sin la subunidad B), una subunidad A o fragmento de la misma podría provocar una respuesta inmunitaria contra el epítotope 11E10.

15 Como se usa en el presente documento, el término "armazón de proteína" o "armazón" se refiere a una estructura de proteína que ha insertado en ella una o más secuencias de aminoácidos de una proteína heteróloga, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de Stx2 expuesta en SEQ ID NOs: 1, 2 o 3. La estructura tridimensional de un armazón de proteína es conocida, y los fragmentos de la proteína heteróloga se insertan en localizaciones estratégicas, por ejemplo, en bucles expuestos en la superficie o en regiones de homología estructural entre el armazón de proteína y la proteína heteróloga. La inserción de un fragmento de Stx2 puede ir acompañada de delección selectiva de ciertas secuencias del armazón de proteína, por ejemplo, una secuencia que tiene homología estructural con la secuencia que se insertará en este armazón y la proteína heteróloga. La inserción de un fragmento de Stx2 puede ir acompañada de delección selectiva de ciertas secuencias del armazón de proteína, por ejemplo, una secuencia que tiene homología estructural con la secuencia que se insertará. En este caso, las secuencias no delecionadas del armazón de proteína pueden usarse para determinar el porcentaje de identidad de secuencia con otra proteína, por ejemplo, Stx1. Proteínas a modo de ejemplo que se han usado como armazón de proteínas son Stx o Stx1 (descritas en el presente documento), proteína verde fluorescente (Abedi et al. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:623-630) y antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) (Hufton et al. (2000) *FEBS Lett.* 475:225-231). Los armazones de proteína excluyen específicamente una marca de proteína, por ejemplo, epítotope FLAG o glutatión-S-transferasa, al final de la cual se fusiona una secuencia de proteínas heteróloga.

20 Por "sustancialmente idénticas" se indica una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos que, cuando se alinea óptimamente, por ejemplo usando los métodos descritos más adelante, comparte al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con una segunda secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos, por ejemplo, Stx2, Stx1, o una proteína quimérica tal como la expuesta en SEQ ID NO: 8. "Identidad sustancial" puede usarse para referirse a diversos tipos y longitudes de secuencia, tales como secuencia de longitud completa, epítotope o péptidos inmunogénicos, dominios funcionales, secuencias codificantes y/o reguladoras, exones, intrones, promotores y secuencias genómicas. El porcentaje de identidad entre dos polipéptidos o secuencias de ácidos nucleicos se determina de diversas formas que están dentro de la experiencia en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el alineamiento de Smith Waterman (Smith, T. F. y M. S. Waterman (1981) *J. Mol. Biol.* 147:195-7); "Best Fit" (Smith y Waterman (1981) *Advances in Applied Mathematics*, 482-489) como se incorpora en GeneMatcher Plus™ (Schwarz and Dayhof (1979) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Dayhoff, M.O., Ed pp 353-358); programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10), BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL, o software Megalign (DNASTAR). Además, aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento sobre la longitud de las secuencias que se comparan. En general, para proteínas, la longitud de comparación de secuencias pueden ser al menos 5 aminoácidos, preferentemente 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 o 315 aminoácidos o más hasta la longitud entera de la proteína. Para ácidos nucleicos, la longitud de secuencias de comparación puede generalmente ser al menos 15, 75, 150, 300, 450, 600, 900 o 945 nucleótidos o más hasta la longitud entera de la molécula de ácido nucleico. Se entiende que para los fines de determinar la identidad de secuencia cuando se compara una secuencia de ADN con una secuencia de ARN, un nucleótido timina es equivalente a un nucleótido uracilo. En una realización, la identidad de secuencia de una proteína, por ejemplo la subunidad A madura de una proteína de toxina Shiga, puede medirse sobre la longitud de un fragmento de SEQ ID NO: 8, por ejemplo, de los aminoácidos 64 a 122 o 64 a 282 de SEQ ID NO: 8. Para secuencias de aminoácidos, sustituciones conservativas normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina.

Por "fragmento" se indica una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene menos del 100 % de la longitud entera de la molécula de ácido nucleico de referencia o polipéptido, preferentemente, al menos el 2 %,

5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %. Un fragmento puede contener, por ejemplo, 10, 15, 75, 150, 300, 450, 600, 900 o 945 o más nucleótidos o 4, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 315 aminoácidos o más. Los fragmentos de la proteína tipo 1 de la toxina Shiga o tipo 2 de la toxina Shiga pueden incluir cualquier porción que sea inferior a la proteína de longitud completa, por ejemplo, un fragmento de 4, 5, 8, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 315, o más aminoácidos de longitud. En un ejemplo, un fragmento incluye los aminoácidos 64 a 122 o 64 a 282 de SEQ ID NO: 8.

Por "enfermedad asociada a toxina Shiga" se indica cualquier enfermedad resultante de un patógeno que expresa una toxina Shiga. El término "enfermedad asociada a toxina Shiga" pretende incluir síndrome urémico hemolítico, shigelosis y enfermedades resultantes de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga e infección por *S. dysenteriae*.

## 10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1A** ilustra subunidades A híbridas Stx1/Stx2. Stx1 se presenta en negro, Stx2 se representa en blanco. Los nombres de las toxinas quiméricas se muestran a la izquierda de las proteínas quiméricas respectivas, y las regiones de Stx2 se enumeran debajo de las subunidades A quiméricas.

15 La **Figura 1B** muestra el análisis de transferencia Western de Stx1, Stx2 y las toxinas quiméricas iniciales se sondaron con anti-Stx1 de conejo y anti-Stx2 policlonal (panel superior) o 11E10 monoclonal (panel inferior). Los carriles 1 y 2 contienen 25 ng de Stx1 o Stx2 purificado, respectivamente. Los carriles 3 a 8 contienen las siguientes toxinas quiméricas: carril 3, Stx1(2A<sub>29-297</sub>); carril 4, Stx1(2A<sub>1-158</sub>); carril 5, Stx1(2A<sub>29-128</sub>); carril 6, Stx1(2A<sub>29-76</sub>); carril 7, Stx1(2A<sub>42-76</sub>); carril 8, Stx1(2A<sub>42-49</sub>).

20 La **Figura 1C** muestra el porcentaje de neutralización de las toxinas quiméricas iniciales con el anticuerpo monoclonal 11E10. Los datos de neutralización se normalizaron de forma que el % de neutralización de Stx2 de longitud completa se estableció al 100 % (% de neutralización real = 65 %) y los niveles de neutralización para el resto de las toxinas se dan como un porcentaje de la neutralización de Stx2 de longitud completa normalizada. Las barras de error representan el error estándar de los valores normalizados.

25 La **Figura 2A** muestra el alineamiento de aminoácidos de StxA1 y StxA2 en las tres regiones que comprenden el epítipo 11E10 del anticuerpo monoclonal. Los aminoácidos negros y grises representan aminoácidos conservados y no conservados, respectivamente; los puntos representan restos idénticos. Las tres regiones del epítipo 11E10 del anticuerpo monoclonal son las siguientes: región A (restos de StxA2 42-49), región B (restos de StxA2 96-100); región C (restos de StxA2 244-259). La numeración de los aminoácidos mostrados en los alineamientos es con respecto a la proteína madura StxA1. StxA1 tiene un aminoácido adicional en la posición 185; esta adición hace que el epítipo de la región C en StxA2 sea un número diferente al de la región correspondiente de Stx1.

30 La **Figura 2B** muestra un diagrama en cinta de la estructura cristalina de Stx2 que muestra las subunidades A<sub>1</sub> y B de Stx2 en gris claro, excepto por tres regiones del epítipo 11E10 del anticuerpo monoclonal. Las regiones A (verde), B (azul) y C (cian) se marcan con flechas negras, grises y blancas, respectivamente. El péptido A<sub>2</sub> se representa en negro, y el sitio activo (rojo) está marcado con un asterisco.

35 La **Figura 2C** muestra una representación de espacio lleno de la estructura cristalina de Stx2. Las regiones A, B y C se indican con flechas.

40 La **Figura 3A** ilustra toxinas quiméricas de segunda generación que contienen subunidades A quiméricas. Stx1 se presenta en negro, mientras que Stx2 se representa en blanco. Los nombres de las toxinas quiméricas se muestran a la izquierda de las proteínas quiméricas respectivas y las regiones de Stx2 se enumeran debajo de las subunidades A quiméricas. Región A, B y C se refieren a los aminoácidos 42-49 (SEQ ID NO: 1), 96-100 (SEQ ID NO: 2), 244-259 (SEQ ID NO: 3), respectivamente de StxA2.

45 La **Figura 3B** representa el análisis de transferencia Western de Stx1, Stx2, y las cinco toxinas quiméricas de segunda generación sondadas con anti-Stx1 de conejo (panel superior) o el anticuerpo monoclonal 11E10 (panel inferior). El carril 1 contiene 25 ng de Stx2 purificada. Los carriles 2 a 6 contienen las siguientes toxinas quiméricas: carril 2, Stx1 +A; carril 3, Stx1 +AB; carril 4, Stx1 +AC; carril 5, Stx1 +BC; carril 6, Stx1 +ABC.

La **Figura 3C** muestra la neutralización de las toxinas híbridas de segunda generación por el anticuerpo monoclonal 11E10. El nivel de neutralización de Stx2 se normalizó al 100 % como en la Fig. 1C. Las barras de error representan el error estándar de los valores normalizados.

50 La **Figura 4A** muestra el análisis de transferencia Western de Stx2 y variantes de Stx2 con el anticuerpo monoclonal 11E10. El carril 1 contiene 25 ng de Stx2 purificada. Los carriles 2 a 5 contienen las siguientes toxinas: carril 2, Stx2c; carril 3, Stx2d; carril 4, Stx2d<sub>act</sub>; carril 5, Stx2e. Las transferencias Western se sondaron con tanto anticuerpos policlonales anti-Stx2 de conejo (panel superior) como el anticuerpo monoclonal 11E10 (panel inferior).

55 La **Figura 4B** representa el porcentaje de neutralización por 11E10 de las variantes de Stx2. El nivel de neutralización de Stx2 se normalizó al 100 % como en la Fig. 1C. Las barras de error representan el error estándar de los valores normalizados.

- La **Figura 5** representa la inhibición de la síntesis de proteínas medida por traducción de ARNm de luciferasa en lisado de reticulocitos de conejo. Se mezcló una alícuota de 0,2 ng de Stx2 purificada con 0, 0,2 o 2 ng de 11E10 y se añadió a lisados de reticulocitos. La inhibición de la síntesis de proteínas se indicó por una reducción de la traducción de ARNm de luciferasa y se midió por bioluminiscencia después de la adición del lisado tratado con toxina a sustrato de luciferina. Se mezcló una muestra de 2 ng de anticuerpo irrelevante del mismo isotipo 13C4 con 2 ng de Stx2 como control negativo. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95 % calculado a partir del error estándar de la relación media. Los valores de probabilidad derivados de una prueba de la t de Student bilateral indican una diferencia significativa en la señal de bioluminiscencia entre muestras con y sin anticuerpo ( $p < 0,005$ ).
- La **Figura 6A-6J** muestra que el anticuerpo monoclonal 11E10 altera la distribución celular global de Stx2 en células Vero. Se mezcló Stx2 con PBS (A, H-J) o 11E10 (B, C y E-G) y luego se añadió a células Vero durante 6 h. Como control, se añadió 11E10 a células Vero en ausencia de Stx2 (D). La toxina se detectó con anticuerpos policlonales contra Stx2 seguido de anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor 488 (A y B), mientras que 11E10 se detectó con IgG anti-ratón conjugada con AlexaFluor 488 (C y D). La co-localización de Stx2 con el marcador de cromosomas temprano EEA1 se evaluó por marcado doble de células intoxicadas. La distribución de Stx2 en presencia (panel E) y ausencia (panel H) de anticuerpo 11E10 se visualizó con anticuerpo monoclonal anti-Stx2 11F11 y secundario fluorescente verde. La distribución del marcador de endosoma EEA1 se visualizó con anticuerpos anti-EEA1 de cabra y secundarios fluorescentes rojos (paneles F y I). Estos patrones de tinción se superpusieron (paneles G y J), y la co-localización de toxina con endosomas se indicó por una coloración amarillanaranja, indicada por flechas.
- Las **Figuras 7A-7D** muestran la secuencia de aminoácidos de la región A de Stx2 (SEQ ID NO: 1) (Fig. 7A), región B de Stx2 (SEQ ID NO: 2) (Fig. 7B), región C de Stx2 (SEQ ID NO: 3) (Fig. 7C) y región B de Stx2e (SEQ ID NO: 19) (Fig. 7D).
- La **Figura 8A** muestra la secuencia de aminoácidos de la quimera Stx1+A (SEQ ID NO: 4). La secuencia conductora procesada está subrayada, y la región A de Stx2 está subrayada en cursiva. La proteína sin procesar tiene 315 aminoácidos en longitud; la proteína madura tiene 293 aminoácidos de longitud.
- La **Figura 8B** muestra la secuencia de aminoácidos de la quimera Stx1+AB (SEQ ID NO: 5). La secuencia conductora procesada está subrayada, y las regiones A y B de Stx2 están subrayadas en cursiva. La proteína sin procesar tiene 315 aminoácidos de longitud; la proteína madura tiene 293 aminoácidos de longitud.
- La **Figura 8C** muestra la secuencia de aminoácidos de la quimera Stx1+AC (SEQ ID NO: 6). La secuencia conductora procesada está subrayada, y las regiones A y C de Stx2 están subrayadas en cursiva. La proteína sin procesar tiene 315 aminoácidos de longitud; la proteína madura tiene 293 aminoácidos de longitud.
- La **Figura 8D** muestra la secuencia de aminoácidos de la quimera Stx1+BC (SEQ ID NO: 7). La secuencia conductora procesada está subrayada, y las regiones B y C de Stx2 están subrayadas en cursiva. La proteína sin procesar tiene 315 aminoácidos de longitud; la proteína madura tiene 293 aminoácidos de longitud.
- La **Figura 8E** muestra la secuencia de aminoácidos de la quimera Stx1+ABC (SEQ ID NO: 8). La secuencia conductora procesada está subrayada, y las regiones A, B y C de Stx2 están subrayadas en cursiva. La proteína sin procesar tiene 315 aminoácidos de longitud; la proteína madura tiene 293 aminoácidos de longitud.
- La **Figura 9A** muestra la secuencia de ADN del operón de Stx1 (SEQ ID NO: 9) que empieza en el codón de iniciación de StxA1 y que termina en el codón de terminación de StxB1.
- La **Figura 9B** muestra la secuencia de ADN de StxA1 (SEQ ID NO: 10) que empieza en el codón de iniciación de StxA1 y que termina en el codón de terminación de StxA1.
- La **Figura 9C** muestra la secuencia de ADN de StxB1 (SEQ ID NO: 11) que empieza en el codón de iniciación de StxB1 y que termina en el codón de terminación de StxB1.
- La **Figura 10A** muestra la secuencia de aminoácidos de StxA1 (SEQ ID NO: 12). La secuencia conductora procesada está subrayada. La proteína sin procesar tiene 315 aminoácidos de longitud; la proteína madura tiene 293 aminoácidos de longitud.
- La **Figura 10B** muestra la secuencia de aminoácidos de StxB1 (SEQ ID NO: 13). La secuencia conductora procesada está subrayada. La proteína sin procesar tiene 89 aminoácidos de longitud; la proteína madura tiene 69 aminoácidos de longitud.
- La **Figura 11A** muestra la secuencia de ADN del operón de Stx2 (SEQ ID NO: 14) que empieza en el codón de iniciación de StxA2 y que termina en el codón de terminación de StxB2.
- La **Figura 11B** muestra la secuencia de ADN de StxA2 (SEQ ID NO: 15) que empieza en el codón de iniciación de StxA2 y que termina en el codón de terminación de StxA2.

La **Figura 11C** muestra la secuencia de ADN de StxB2 (SEQ ID NO: 16) que empieza en el codón de iniciación de StxB2 y que termina en el codón de terminación de StxB2.

La **Figura 12A** muestra la secuencia de aminoácidos de StxA2 (SEQ ID NO: 17). La secuencia conductora procesada está subrayada. La proteína sin procesar tiene 319 aminoácidos de longitud; la proteína madura tiene 297 aminoácidos de longitud.

La **Figura 12B** muestra la secuencia de aminoácidos de StxB2 (SEQ ID NO: 18). La secuencia conductora procesada está subrayada. La proteína sin procesar tiene 89 aminoácidos de longitud; la proteína madura tiene 70 aminoácidos de longitud.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En general, la invención caracteriza composiciones y métodos relacionados con el descubrimiento del epítipo 11E10 de la proteína Stx2. Los presentes inventores han encontrado que el epítipo 11E10 incluye al menos una, dos o tres de las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3. Las composiciones y métodos de la invención pueden ser útiles para la detección, tratamiento o prevención de enfermedades asociadas a toxina Shiga. Por ejemplo, un sujeto que tiene, o en riesgo de desarrollar, una enfermedad asociada a toxina Shiga (por ejemplo, síndrome urémico hemolítico y enfermedades asociadas a *E. coli* e infección por *S. dysenteriae*) puede tratarse con un péptido que contiene el epítipo 11E10 o con anticuerpos que se unen específicamente al epítipo 11E10 de la proteína Stx2.

### I. INDICACIONES

Las enfermedades asociadas a toxina Shiga incluyen aquellas resultantes de infección con *S. dysenteriae* que produce toxina Shiga o *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), más en particular el serotipo O157:H7. Estas infecciones frecuentemente producen síndrome urémico hemolítico (SUH), que se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia trombótica e insuficiencia renal.

Los compuestos y métodos de la invención son útiles para tratar sujetos que tienen, o en riesgo de desarrollar, una enfermedad asociada a toxina Shiga. Tales sujetos incluirían niños en la guardería o ancianos en residencias de ancianos. En un ejemplo, el sujeto está en una guardería o en una residencia de ancianos donde se ha detectado un caso de diarrea por ECEH. En este ejemplo, el sujeto puede o puede no haber desarrollado la enfermedad. Los métodos y composiciones de la invención pueden usarse para tratar la infección del individuo infectado con ECEH, para detectar otros individuos infectados, y para prevenir la diseminación de ECEH en la guardería o residencia de ancianos.

### II. ANTICUERPOS

La invención incluye la producción de anticuerpos que se unen específicamente al epítipo 11E10 de la proteína tipo 2 de la toxina Shiga (Stx2) y los propios anticuerpos. Deseablemente, un anticuerpo tal no se une detectablemente a Stx1. La capacidad única de los anticuerpos para reconocer y unirse específicamente a proteínas diana proporciona enfoques para tanto el diagnóstico como el tratamiento de enfermedades relacionadas con *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (ECTS). La invención proporciona la producción de anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos antiidiotípicos, anticuerpos murinos y otros de mamífero, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpo dímeros o tetrámeros, anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv y fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno tales como Fab, diacuerpos y fragmentos Fab'), regiones de unión recombinantes basadas en regiones de anticuerpo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos primatizados, anticuerpos humanizados y completamente humanos, anticuerpos de dominios delecionados, y anticuerpos marcados con un marcador detectable, o acoplado a una toxina o radionúclido. Tales anticuerpos se producen por métodos convencionales conocidos en la técnica. En un aspecto, la invención incluye la preparación de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al epítipo 11E10 de Stx2 donde la preparación incluye el uso de un polipéptido que contiene al menos una, dos o tres secuencias seleccionadas de las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2 o 3. Un ejemplo es la proteína expuesta en SEQ ID NO: 8.

#### Anticuerpos policlonales

Pueden prepararse anticuerpos policlonales inmunizando conejos u otros animales inyectando antígeno seguido de refuerzos posteriores a intervalos apropiados. Los animales se sangran y los sueros se ensayan contra proteína purificada normalmente por ELISA.

Los anticuerpos policlonales que se unen específicamente al epítipo 11E10 pueden producirse en animales por inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) múltiples del antígeno y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el péptido que contiene el epítipo 11E10 con una proteína que es inmunogénica en la especie que va a inmunizarse (por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja) usando un agente bifuncional o derivatizante (por ejemplo, éster de maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugación mediante restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina), glutaraldehído o succínico anhídrido).

Por ejemplo, pueden inmunizarse animales contra el epítotope 11E10, conjugados inmunogénicos o derivados combinando 1 µg a 1 mg del péptido o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después los animales se sangran y el suero se ensaya para el título de anticuerpos para el antígeno o un fragmento del mismo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo polipéptido, pero se conjuga con una proteína diferente y/o mediante un reactivo de reticulación diferente. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteína. Por tanto, se usan adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

Pueden producirse policlonales quiméricos, humanizados o completamente humanos en animales transgénicos para genes de la inmunoglobulina humana, o aislando dos o más linfocitos B reactivos con Stx2 de un sujeto para material de partida.

También pueden purificarse policlonales y seleccionarse (tal como mediante afinidad por un péptido de antígeno conformacionalmente restringido), iterativamente si fuera necesario, para proporcionar un anticuerpo monoclonal. Alternativamente o adicionalmente, puede emplearse clonación del ácido nucleico que codifica un único anticuerpo de un linfocito.

### Anticuerpos monoclonales

En otra realización de la invención, se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos (es decir, los anticuerpos individuales que incluyen la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que existen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores). Así, el término monoclonal indica el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por métodos conocidos en la técnica, tales como el método de hibridomas de Kohler y Milstein fusionando esplenocitos de ratones inmunizados con células tumorales continuamente replicantes tales como células de mieloma o de linfoma (Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495 - 497; Gutfre y Milstein (1981) Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73: 1 - 46, Langone and Banatis eds., Academic Press). Las células de hibridoma se clonan entonces por métodos de dilución limitante y los sobrenadantes se ensayan para la producción de anticuerpos por ELISA, RIA o bioensayo. En otra realización, pueden prepararse monoclonales por métodos de ADN recombinante.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales (mAb) que se unen específicamente al epítotope 11E10, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Por ejemplo, la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein ((1975) arriba, además de en Kohler y Milstein (1976) Eur J Immunol. 6: 511 - 519; Kohler et al. (1976) Eur J Immunol. 6: 292 -295; Hammerling et al. (1981) en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 563 - 681) y la técnica de triomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos (Kozbor et al. (1983) Immunol Today 4: 72 - 79) y la técnica de hibridomas del VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Col et al. (1985) en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los mAb en la invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. En una realización adicional de la invención, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales libres de gérmenes utilizando tecnología conocida en la técnica.

En general, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza con el polipéptido que incluye el epítotope 11E10 para inducir que los linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que pueden unirse específicamente al antígeno o fragmento del mismo usado para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se inmunizan *in vitro*.

Los esplenocitos del animal huésped inmunizado (por ejemplo, un ratón) se extraen y se fusionan con una línea celular adecuada, por ejemplo, una línea de células de mieloma, usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103, Academic Press). Puede emplearse cualquier línea de células de mieloma adecuada según la presente invención; sin embargo, células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. De entre éstas, líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de distribución de células de Salk Institute, San Diego, Calif. EE.UU., y células SP-2 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. EE.UU.

Las células de hibridoma así preparadas pueden sembrarse y cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Las células de hibridoma obtenidas mediante un medio de selección y/o de

cultivo tal en el que las células de hibridoma están siendo mantenidas pueden entonces ensayarse para identificar la producción de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al epítotope 11E10. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) o usando un instrumento Biacore. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Rodbard ((1980) Anal Biochem. 107: 220-239).

Después de identificarse células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, arriba). Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes (véase por ejemplo, Skerra et al. (1993) Curr Opin Immunol. 5: 256 - 262 y Pluckthun (1992) Immunol Rev. 130: 151 - 188).

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo toda o parte de la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Morrison et al. (1984) Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 81: 6851 - 6855), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos quiméricos o híbridos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-epítotope 11E10. Normalmente, tales polipéptidos no de inmunoglobulina están sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o están sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico que incluye un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por el epítotope 11E10 según la invención y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

### Anticuerpos modificados

Los anticuerpos modificados de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales quiméricos (por ejemplo, quimeras humano-ratón), anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos monoclonales humanizados. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones derivan de diferentes especies de animales, tales como aquellas que tienen una región constante de inmunoglobulina humana y una región variable derivada de un mAb murino (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.816.567 y 4.816.397). Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina, o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana, tal como una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región estructural de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.585.089).

Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos con restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos con restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden incluir restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR importadas o secuencias de la región estructural. En general, el anticuerpo humanizado incluirá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas de las regiones CDR se corresponden con aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas de las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también incluirá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo usando métodos descritos en los documentos WO 87/02671; EP 184.187; EP 171.496; EP 173.494; WO 86/01533; US 4.816.567; EP 125.023; Better et al. (1988) Science 240: 1041 - 1043; Liu et al. ((1987) Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 84: 3439 - 3443); Liu et al. ((1987) J Immunol. 139: 3521 - 3526); Sun et al. ((1987) Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 84: 214 - 218); Nishimura et al. ((1987) Cancer Res. 47: 999 - 1005); Wood et al.

((1985) *Nature* 314: 446 - 449); Shaw et al. ((1988) *J Natl Cancer Inst.* 80: 1553 - 1559); Morrison ((1985) *Science* 229: 1202 - 1207); Oi et al. ((1986) *Biotechniques.* 4: 214); US 5.225.539; Jones et al. ((1986) *Nature* 321: 552 - 525); Verhoeyan et al. ((1988) *Science* 239: 1534); y Beidler et al. ((1988) *J Immunol.* 141: 4053 - 4060). Véase más adelante para otra discusión de anticuerpos humanizados y métodos relacionados con los mismos.

- 5 Otro medio altamente eficiente para generar anticuerpos recombinantes se desvela por Newman ((1992) *Biotechnology.* 10: 1455 - 1460). Véanse también las patentes de EE.UU. N.º 5.756.096; 5.750.105; 5.693.780; 5.681.722; y 5.658.570.

10 Son muy conocidos en la técnica métodos de humanización de anticuerpos no humanos. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores como se ha descrito anteriormente (incluyendo Jones et al. 0 ((1986) *Nature* 321: 522 - 525); Riechmann et al. ((1988) *Nature* 332: 323 - 327); Verhoeyen et al. ((1988) *Science* 239: 1534 - 1536), sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (véanse las patentes de EE.UU. N.º 4.816.567 y 6.331.415). En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos

15 restos de FR están sustituidos con restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado método de ajuste óptimo, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca entera de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que es la más próxima a la del roedor se

20 acepta entonces como la región estructural humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al. (1993) *J Immunol.* 151: 2296 - 2308; Chotia y Lesk (1987) *J Mol Biol.* 196: 901 - 917). Otro método usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 89: 4285 - 4289; Presta et al. (1993) *J Immunol.* 151: 2623 - 2632).

25

También se desea que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno (es decir, el epítipo 11E10 de Stx2) y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, se preparan anticuerpos humanizados mediante un análisis de secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Comúnmente están disponibles

30 modelos de inmunoglobulina tridimensional y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de esta muestra permite el análisis de la probable función de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta

35 forma, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse de las secuencias consenso y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseado, tal como elevada afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los restos de CDR están directa y más sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno.

Los anticuerpos completamente humanos son útiles para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Tales anticuerpos pueden producirse, por ejemplo, usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de

40 cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humana. Los ratones transgénicos pueden inmunizarse en el modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, un polipéptido que incluye el epítipo 11E10. Por ejemplos, véanse las publicaciones PCT N.º WO 94/02602, WO 00/76310; las patentes de EE.UU. N.º 5.545.806; 5.545.807; 5.569.825; 6.150.584; 6.512.097; y 6.657.103; Jakobovits et al. ((1993) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 90: 2551); Jakobovits et al. ((1993) *Nature* 362: 255 - 258); Bruggemann et al. ((1993) *Year in Immunol.* 7: 33 - 40); Mendez et al. ((1997) *Nat Gene.* 15: 146 - 156), y Green y Jakobovits ((1998) *J Exp Med.* 188: 483 - 495).

45

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos por el método de hibridoma. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor ((1984) *J Immunol.* 133: 3001 - 3005); *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51 - 63, Marcel Dekker, Inc., New York); y Boerner et al. ((1991) *J Immunol.* 147: 86 - 95).

50

También pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada selección guiada. En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al. (1994) *Biotechnology.* 12: 899 - 903).

55

Ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv monocatenarios y anticuerpos incluyen aquellas descritas en las patentes de EE.UU. N.º 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al. ((1991) *Meth Enzymol.* 203: 46 - 88); Shu et al. ((1993) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 90: 7995 - 7999); y Skerra et al. ((1988) *Science* 240: 1038 - 1040).

Alternativamente, puede usarse tecnología de presentación en fagos (McCafferty et al. (1990) Nature 348: 552 - 553) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Puede realizarse presentación en fagos en una variedad de formatos. Véase, por ejemplo, Johnson y Chiswell ((1993) Curr Opin Struct Biol. 3: 564 - 571). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson et al. ((1991) Nature 352: 624 - 628) aislaron una diversa matriz de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y anticuerpos para una diversa matriz de antígenos (incluyendo auto-antígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al. ((1991) J Mol Biol. 222: 581 - 597), o Griffith et al. ((1993) EMBO J. 12: 725 - 734).

La invención proporciona fragmentos funcionalmente activos, derivados o análogos de las moléculas de inmunoglobulina que se unen específicamente a una proteína que incluye el epítipo 11E10. Funcionalmente activo en este contexto significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de inducir anticuerpos anti-antiidiotípicos (es decir, anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo del que se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una realización preferida, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede potenciarse por la delección de las secuencias de región estructural y de CDR que estén en el extremo C con respecto a la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, pueden usarse péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR en ensayos de unión con el antígeno por cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica.

La presente invención proporciona fragmentos de anticuerpos tales como, pero no se limitan a, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab y scFv. Pueden generarse fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopes específicos por técnicas conocidas, por ejemplo, por escisión mediada por pepsina o papaína.

La invención también proporciona dímeros de cadena pesada y de cadena ligera de los anticuerpos de la invención, o cualquier fragmento mínimo de los mismos tales como Fv o anticuerpos monocatenarios (SCA) (por ejemplo, como se describen en la patente de EE.UU. N.º 4.946.778; Bird ((1988) Science 242: 423 - 42); Huston et al. ((1988) Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 85: 5879 - 5883); y Ward et al. ((1989) Nature 334: 544 - 54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo de la invención. Se forman anticuerpos monocatenarios por enlace de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácido, produciendo un péptido monocatenario. Pueden usarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al. (1988) Science 242: 1038 - 1041).

Alternativamente, puede obtenerse un clon que codifica al menos la porción Fab del anticuerpo cribando bibliotecas de expresión de Fab (por ejemplo, como se describe en Huse et al. ((1989) Science 246: 1275 - 1281)) para clones de fragmentos Fab que se unen el antígeno específico o cribando bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Clackson et al. ((1991) Nature 352: 624 - 628) y Hanes y Pluckthun ((1997) Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 94: 4937 - 4942)).

En otras realizaciones, la invención proporciona proteínas de fusión de las inmunoglobulinas de la invención, o fragmentos funcionalmente activos de las mismas. En un ejemplo, la inmunoglobulina se fusiona mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), en tanto el extremo N como el extremo C, con una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, preferentemente al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es la inmunoglobulina. Preferentemente, la inmunoglobulina, o fragmento de la misma, se une covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante. Como se ha establecido anteriormente, tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, aumento de la semivida *in vivo*, y potenciar la administración de un antígeno a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario.

En otra realización, la invención proporciona las composiciones y uso de anticuerpos reunidos, fragmentos de anticuerpos, y las otras variantes de anticuerpo descritas en el presente documento.

### Administración terapéutica

La invención también caracteriza la administración de anticuerpos desarrollados usando los métodos anteriores (por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente al epítipo 11E10 de Stx2) a sujetos que tienen, o en riesgo de desarrollar, una enfermedad asociada a toxina Shiga.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de un modo de acuerdo con la buena práctica médica. Factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el sujeto particular que está tratándose, el estado clínico del sujeto individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos para profesionales médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo que se une específicamente al epítipo 11E10 de Stx2 que va a administrarse estará gobernada por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, tratar o estabilizar una enfermedad asociada a toxina Shiga, o síntomas asociados a la misma. El anticuerpo específico para el epítipo 11E10 no necesita ser formulado, pero se formula

opcionalmente con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar enfermedades asociadas a toxina Shiga (por ejemplo, anticuerpos específicos para Stx1, que incluyen 13C4, o derivados humanizados o quiméricos de los mismos). La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo específico para el epítotope 11E10 de Stx2 presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores tratados anteriormente.

El anticuerpo se administra por cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes de anticuerpo. Preferentemente, la dosis se administra mediante inyecciones, lo más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

### III. VACUNAS

La invención caracteriza composiciones para estimular una respuesta inmunitaria contra la proteína Stx2.

Individuos que tienen o está en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a toxina Shiga pueden tratarse por administración de una composición (por ejemplo, una vacuna) que contiene el epítotope 11E10 de la invención, donde el polipéptido no incluye el polipéptido Stx2 de longitud completa o la subunidad de StxA2 procesada, preferentemente en una cantidad inmunogénicamente eficaz. La composición puede administrarse profilácticamente y/o terapéuticamente.

Pueden desarrollarse diferentes tipos de vacunas según procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vacuna puede ser una basada en péptido (véase, por ejemplo, Smith et al. ((2006) Vaccine 24:4122-4129)), basada en ácido nucleico (por ejemplo, véase Bentacor et al., "DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic Escherichia coli 1 (EHEC) Shiga-like toxin 2 (Stx2) A2 and B subunits confers protective immunity to Stx challenge in the murine model" Clin. Vaccine Immunol. (publicación electrónica antes de su publicación impresa, PMID 19176691)), vacunas basadas en bacterias o virus. Una formulación de vacuna que contiene un polipéptido o ácido nucleico que codifica el polipéptido que incluye el epítotope 11E10 puede contener una variedad de otros componentes, que incluyen estabilizadores. La vacuna también puede incluir o co-administrarse con uno o más adyuvantes adecuados. La relación de adyuvante con respecto a polipéptido que incluye el epítotope 11E10 en la vacuna puede determinarse por métodos convencionales para un experto en la materia.

En otra realización, las vacunas de péptido pueden utilizar péptidos que incluyen el epítotope 11E10 o derivados funcionales del mismo como vacuna profiláctica o terapéutica de varias formas, que incluyen: 1) como monómeros o multímeros de la misma secuencia, 2) combinadas contiguamente y o no contiguamente con secuencias adicionales que pueden facilitar la agregación, promover la presentación o procesamiento del epítotope (por ejemplo, secuencias de direccionamiento de clase I/II) y/o un anticuerpo adicional, epítopos T colaboradores o de CTL para aumentar la inmunogenicidad del epítotope 11E10, 3) químicamente modificados o conjugados con agentes que aumentarían la inmunogenicidad o administración de la vacuna (por ejemplo, cadenas de ácido graso o de acilo, KLH, toxoide tetánico o toxina del cólera), 4) cualquier combinación de los anteriores, 5) cualquiera de los anteriores en combinación con adyuvantes, que incluyen, pero no se limitan a, geles inorgánicos tales como hidróxido de aluminio, y emulsiones de agua en aceite tales como adyuvante incompleto de Freund, sales de aluminio, saponinas o triterpenos, MPL, toxina del cólera, ISCOM'S®, PROVAX®, DETOX®, SAF, adyuvante de Freund, Alum®, Saponin®, entre otros, y particularmente aquellos descritos en las patentes de EE.UU. N.º 5.709.860; 5.695.770; y 5.585.103; y/o en combinación con vehículos de administración, que incluyen, pero no se limitan a, liposomas, VPL o partículas similares a virus, microemulsiones, vectores bacterianos y virales atenuados o muertos, y microesferas degradables (véanse, por ejemplo, Kersten y Hirschberg ((2004) Expert Rev of Vaccines. 3: 453 - 462); Sheikh et al. ((2000) Curr Opin Mol Ther. 2: 37-54)), y 6) administrados por cualquier vía o como un medio para cargar células con antígeno *ex vivo*.

Dosificaciones de un polipéptido que incluye un epítotope 11E10, donde el polipéptido no es Stx2 de longitud completa, administradas al individuo como tanto una terapia profiláctica como terapia contra una enfermedad asociada a toxina Shiga, pueden determinarse por un experto en la materia. Generalmente, las dosificaciones contendrán entre aproximadamente 10 µg y 1.000 mg, preferentemente entre aproximadamente 10 mg y 500 mg, más preferentemente entre aproximadamente 30 mg y 120 mg, más preferentemente entre aproximadamente 40 mg y 70 mg, lo más preferentemente aproximadamente 60 mg del polipéptido que incluye el epítotope 11E10.

Al menos una dosis del polipéptido que incluye el epítotope 11E10 se administrará al sujeto, preferentemente al menos dos dosis, más preferentemente cuatro dosis, con hasta seis o más dosis totales administradas. Puede ser deseable administrar dosis de refuerzo del polipéptido que incluye el epítotope 11E10 a intervalos de una o dos semanas después de la última inmunización, generalmente una dosis de refuerzo que contiene menos o la misma cantidad de epítotope 11E10 que la dosis inicial administrada. En un ejemplo, la pauta de inmunización se administrará en cuatro dosis a intervalos de una semana. Como un polipéptido o un ácido nucleico pueden degradarse en el estómago, la inmunización se administra preferentemente por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular,

intravenosa o intradérmica). El progreso de sujetos inmunizados puede ir seguido de evaluación médica general, cribado para infección por serología y/o examen gastroscópico.

**IV. EJEMPLOS**

**Ejemplo 1**

5 El anticuerpo monoclonal 11E10 reconoce la subunidad A<sub>1</sub> de Stx2. La unión de 11E10 a Stx2 neutraliza tanto las actividades citotóxicas como letales de Stx2, pero el anticuerpo monoclonal no se une a o neutraliza Stx1 a pesar del 55 % de identidad y el 68 % de similitud en los aminoácidos de las subunidades A maduras. En este estudio, los presentes inventores buscaron identificar segmento(s) en Stx2 que constituyen el epítipo 11E10 y determinar cómo el reconocimiento de esa región por 11E10 conduce a la inactivación de la toxina. Hacia aquellos objetivos, los presentes inventores generaron un conjunto de moléculas Stx1/Stx2 quiméricas y entonces evaluaron la capacidad de 11E10 para reconocer aquellas toxinas híbridas por análisis de transferencia Western y para neutralizarlas en ensayos de citotoxicidad de células Vero. Los presentes inventores también compararon las secuencias de aminoácidos y estructuras cristalinas de Stx1 y Stx2 para extensiones de disimilitud que podrían predecir un epítipo de unión sobre Stx2 para 11E10. Mediante estas evaluaciones, los presentes inventores llegaron a la conclusión de que el epítipo 11E10 comprende tres regiones no contiguas que rodean el sitio activo de Stx2. Para preguntar cómo 11E10 neutraliza Stx2, los presentes inventores examinaron la capacidad de complejos 11E10/Stx2 para dirigirse a ribosomas. Los presentes inventores encontraron que la unión de 11E10 a Stx2 previno que la toxina inhibiera la síntesis de proteínas en un ensayo *in vitro*, pero también alteró la distribución celular global de Stx2 en células Vero. Los presentes inventores proponen que la unión del anticuerpo monoclonal 11E10 a Stx2 neutraliza al menos algunos, si no todos, de los efectos de la toxina y puede así prevenir que la toxina llegue a o inactive los ribosomas.

Los presentes inventores han investigado estrategias de inmunización pasiva para neutralizar las Stx asociadas a infecciones por ECTS (Dowling et al. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1808-1812, Edwards et al. (1998) en J. B. Kaper and A. D. O'Brien (ed.), *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. ASM Press, Washington, DC., Kimura et al. (2002) *Hybrid. Hybridomics. strains*. ASM Press, Washington, DC., Kimura et al. (2002) *Hybrid. Hybridomics.* 21:161-168, Ma et al. (2008) *Immunol. Lett.* 121:110-115, Mukherjee et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:612-619, Mukherjee et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:5896-5899). La estrategia de inmunización pasiva de los presentes inventores se basa en anticuerpos monoclonales murinos desarrollados en este laboratorio que se unen específicamente a y neutralizan Stx/Stx1 o Stx2 (Strockbine et al. (1985) *Infect. Immun.* 50:695-700, Perera et al. (1988) *J Clin. Microbiol.* 26:2127-2131). El anticuerpo monoclonal 11E10 se generó por inmunización de ratones BALB/c con Stx2 convertido en toxoide mediante tratamiento con formaldehído (Perera et al., arriba). Por análisis de transferencia Western, el anticuerpo monoclonal 11E10 reconoce específicamente el fragmento A<sub>1</sub> de Stx2 y neutraliza Stx2 para células Vero y ratones, pero no se une o neutraliza Stx/Stx1 (Edwards et al., arriba; Perera et al. arriba). El anticuerpo monoclonal 11E10 murino se modificó para contener una región constante humana para reducir las posibilidades de que un anticuerpo receptor generara una respuesta de anticuerpos anti-ratón. Este anticuerpo quimérico humano/ratón, llamado *caStx2*, se sometió satisfactoriamente a ensayos clínicos de fase I (Dowling et al., arriba). En este informe, los presentes inventores definen el epítipo sobre la subunidad A de Stx2 reconocida por el anticuerpo monoclonal 11E10 murino (y, por tanto, también por *caStx2*) sobre la subunidad A de Stx2, y presentan evidencia de que el anticuerpo monoclonal bloquea la acción enzimática de la toxina *in vitro* y también altera el tráfico de toxinas en células Vero.

**40 Materiales y métodos**

**Cepas bacterianas, plásmidos, Stx1 y Stx2 purificados y anticuerpos monoclonales 11E10 y 13C4.**

Se cultivaron bacterias en caldo de Luria-Bertani (LB) o sobre agar de LB (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) complementado con 100 µg/ml de ampicilina según se necesitara para la selección de plásmidos recombinantes. Las cepas bacterianas y los plásmidos usados en este estudio se enumeran en la Tabla 1. Se purificaron Stx1 y Stx2 por cromatografía de afinidad como se describe previamente (Melton-Celsa y O'Brien (2000) p. 385-406. en *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 145. Springer-Verlag, Berlin) y los anticuerpos monoclonales 11E10, 11F11 (específicos para Stx2 (Perera et al., arriba) y 13C4 (específico para Stx1 (Strockbine et al. (1985) *Infect. Immun.* 50:695-700)) se produjeron en este laboratorio y se depositaron en BEI Resources (Manassas, VA).

**50 Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio.**

| Cepa o plásmido                | Características relevantes  | Fuente o referencia |
|--------------------------------|---|---------------------|
| <b>Cepas de <i>E. coli</i></b> |   |                     |
| Dh5α                           | F- <i>_80 dlacZ_M15 (lacZYA-argF)UI69 endA1 recAlhsdR17(rK-mK +) deoR thi-1 phoA supE44 -gyrA96 relA1</i> | Gibco BRL           |

| Cepa o plásmido                | Características relevantes  | Fuente o referencia                                  |
|--------------------------------|---|--|
| XL10 Gold                      | Tetr $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ\Delta M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]$ | Stratagene   |
| B121 (DE3)                     | <i>F-ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>m<sub>b</sub>-) gal dcm</i> (DE3)  | Novagen  |
| EH250                          | Cepa aislada de Ount:H12 de <i>E. coli</i> ; productora de Stx2d  | Pierard et al. (1998) J Clin Microbiol 36: 3317-3322 |
|                                |   |  |
| <b>Vectores de clonación</b>   |   |  |
| pBluescript II KS (-)          | Vector de clonación de <i>E. coli</i> (Amp <sup>r</sup> )   | Stratagene   |
| pTRCHIS2c                      | Vector de expresión de <i>E. coli</i> (amp <sup>r</sup> )   | Invitrogen   |
|                                |   |  |
| <b>Plásmidos recombinantes</b> |   |  |
| pCKS120                        | Clon de la toxina pBR328 de <i>stx<sub>2c</sub></i>   | Lindgren et al. (1994) Infect. Immun. 62: 623-631    |
| pJES101                        | Clon de la toxina pKS (-)de <i>stx<sub>2e</sub></i>   | Samuel et al. (1990) Infect. Immun. 58: 611-618      |
| pSQ543                         | Clon de la toxina pSK (-)de <i>stx<sub>2dact</sub></i>  | Lindgren et al. (1994) Infect. Immun. 62: 623-631    |
| pMJS1                          | Clon de la toxina pBluescript II KS (-)de <i>stx<sub>1</sub></i>  | Smith et al. (2006) Vaccine 24: 4122-4129            |
| pMJS2                          | Clon de la toxina pBluescript II KS (-)de <i>stx<sub>2</sub></i>  | Smith et al. (2006) Vaccine 24: 4122-4129            |
| pMJS9                          | Clon de la toxina pBluescript II KS (-), gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 29-297 + StxB2)              | Este estudio   |
| pMJS10                         | Clon de la toxina pBluescript II KS (-),gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 1-158)                        | Este estudio   |
| pMJS11                         | Clon de la toxina pTrcHis2 C, gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 1-158)                                  | Este estudio   |
| pMJS 13                        | Clon de la toxina pBluescript II KS (-),gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 29-128)                       | Este estudio   |
| pMJS15                         | Clon de la toxina pBluescript II KS (-),gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aa 29-76)                                 | Este estudio   |
| pMJS16                         | Clon de la toxina pBluescript II KS (-),gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 42-76)                        | Este estudio   |
| pMJS28                         | Clon de la toxina pBluescript II KS (-),gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 42-49)                        | Este estudio   |
| pMJS49                         | Clon de la toxina pTrcHis2 C de <i>stx<sub>1</sub></i>  | Este estudio   |
| pMJS49A                        | Clon de la toxina pTrcHis2 C, gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 42-49)                                  | Este estudio   |

| Cepa o plásmido | Características relevantes  | Fuente o referencia                           |
|-----------------|---|---|
| pMJS49AB        | Clon de la toxina pTrcHis2 C, gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 42-49, 96-100)          | Este estudio                                  |
| pMJS49AC        | Clon de la toxina pTrcHis2 C, gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 42-49, 244-259)         | Este estudio                                  |
| pMJS49BC        | Clon de la toxina pTrcHis2 C, gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 96-100, 244-259)        | Este estudio                                  |
| pMJS49ABC       | Clon de la toxina pTrcHis2 C, gen <i>stxA<sub>1</sub>-stxA<sub>2</sub></i> quimérico (StxA2 = aminoácidos 42-49, 96-100, 244-259) | Este estudio                                  |
| pMJS50          | Clon de la toxina pTrcHis2 C de <i>stx<sub>2</sub></i>  | Robinson et al. (2006)<br>PNAS 103: 9667-9672 |
| pMJS52          | Clon de la toxina pTrcHis2 C de <i>stx<sub>2c</sub></i>   | Este estudio                                  |
| pMJS59          | Clon de la toxina pTrcHis2 C de <i>stx<sub>2d</sub></i>   | Este estudio                                  |
| pMJS49ABC*      | pMJS49ABC con la mutación Y77S  | Este estudio                                  |

#### Construcción de plásmidos de toxina quimérica.

Se generaron seis genes de toxina quimérica que contenían las porciones de tanto *stxA<sub>1</sub>* como *stxA<sub>2</sub>* por PCR con el corte y empalme por el protocolo de extensión solapada (SOE) (Higuchi (1989) p. 61-70. En H. A. Erlich (ed.), PCR technology. Stockton Press, New York), y los productos de PCR se ligaron en pBluescript II KS (-) (Stratagene, La Jolla, CA). Los genes de toxina quimérica contuvieron los promotores nativos y secuencias de Shine-Dalgarno, y los niveles de expresión de toxina de cinco de los clones fueron suficientes bajo aquellas condiciones. Para aumentar el nivel de expresión de la subunidad A de un clon (pMJS11), el operón de toxina se amplificó por PCR una segunda vez y se añadió una secuencia de Shine-Dalgarno optimizada [TAAGGAGGACAGCTATG (la secuencia de Shine-Dalgarno optimizada está subrayada y el sitio de inicio de la traducción para StxA2 está en negrita) SEQ ID NO: 20] en la dirección 5' de *stxA<sub>2</sub>*. Este último producto de PCR se ligó en el vector de expresión pTrcHis2 C (Invitrogen, Carlsbad, CA) que tiene un promotor inducible por isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). Todos los cebadores usados en este estudio se enumeran en la Tabla 2. La secuencia de ADN de cada construcción creada para este estudio se confirmó antes de uso.

**Tabla 2. Cebadores de oligonucleótidos sintético usados en este estudio**

| Cebador | Secuencia (5'-3') <sup>a,b</sup>                                    | Finalidad/ región de homología  |
|---------|---|---|
| MJS1    | GATCGGATCCCCCTGTAACGAAGTTTGCCTAACAC<br>GC (SEQ ID NO: 21)           | Cebador en la dirección 5' de <i>stx<sub>1</sub></i> , usado para generar pMJS9, pMJS13, pMJS15, pMJS16 y pMJS28          |
| MJS2    | GATCGAATTCTCGCTTACGATCATCAAAGAGATC<br>ATACC (SEQ ID NO: 22)         | Cebador en la dirección 3' de <i>stx<sub>1</sub></i> , usado para generar pMJS10, pMJS11, pMJS13, pMJS15, pMJS16 y pMJS28 |
| MJS5    | GATCGGATCCAGCAAGGGCCACCATATCACATAC<br>CGCC (SEQ ID NO: 23)          | Cebador en la dirección 5' de <i>stx<sub>2</sub></i> , usado para generar pMJS10  |
| MJS6    | CAGGGGAATTCACCATGCGAAATTTTTTAAACAA<br>ATGC (SEQ ID NO: 24)          | Cebador en la dirección 3' de <i>stx<sub>2</sub></i> , usado para generar pMJS9   |
| 2A29F   | GAACATATATCTCAGGGGACCAC (SEQ ID NO: 25)                             | Usado con 1A28R para generar pMJS9, pMJS13 y pMJS15   |
| 1A28R   | GTGGTCCCCTGAGATATATGTTCTAATGGAGTAC<br>CTATTGCAGAGCG (SEQ ID NO: 26) | Usado con 2A29F para generar pMJS9, pMJS13 y pMJS15   |
| 1A159F  | TTACGGTTTGTACTGTGACAGCTGAAGC (SEQ ID<br>NO: 27)                     | Usado con 2A158R para generar pMJS10 y pMJS11   |

ES 2 614 803 T3

| Cebador | Secuencia (5'-3') <sup>a,b</sup>  | Finalidad/ región de homología   |
|---------|---|--|
| 2A158R  | GCTTCAGCTGTCACAGTAACAAACCGTAAAACCTG<br>CTCTGGATGCATCTCTGGT (SEQ ID NO: 28)            | Usado con 1A159F para generar pMJS10 y pMJS11  |
| 1A129F  | CAGATAAATCGCCATTCGTTGA (SEQ ID NO: 29)  | Usado con 2A128R para generar pMJS13   |
| 2A128R  | TCAACGAATGGCGATTTATCTGCATTCCGGAACG<br>TTCCAG CGC (SEQ ID NO: 30)                      | Usado con 1A129F para generar pMJS13   |
| 2A42F   | GGTACGTCTTTACTCATGATTAACCACACCCAC<br>CGGGCAGTTATTTTGC (SEQ ID NO: 31)                 | Usado con 1A41R para generar pMJS16  |
| 1A41R   | GCAAAATAACTGCCCGTGGGGTGTGGTTAATCA<br>TCAGTAAAGACGTACC (SEQ ID NO: 32)                 | Usado con 2A42F para generar pMJS16  |
| 1A77F   | TATGTGACAGGATTTGTTAACAGGAC (SEQ ID NO: 33)  | Usado con 2A76R para generar pMJS15  |
| 2A76R   | GTCCTGTTAAACAAATCCTGTCACATATAAATTAT<br>TTTGCT CAATAATCAGACGAAGATGG<br>(SEQ ID NO: 34) | Usado con 1A77F para generar pMJS15  |
| 1A51    | AGGAGGACAGCTATGAAAATAATTATTTTAGAG<br>TGCTA (SEQ ID NO: 35)                            | Cebador en la dirección 5' de <i>stxA</i> <sub>1</sub> N.º 1 con secuencia de Shine-Dalgarno optimizada, usado para generar pMJS49 |
| 1A52    | GATCGGATCCTAAGGAGGACAGCTATGAAAATAA<br>TT (SEQ ID NO: 36)                              | Cebador en la dirección 5' de <i>stxA</i> <sub>1</sub> N.º 2 con secuencia de Shine-Dalgarno optimizada, usado para generar pMJS49 |
| 1BC1    | GGTGGTGGTGACGAAAAATAACTTCGCTGAATCC<br>(SEQ ID NO: 37)                                 | Cebador en la dirección 3' marcado con His de <i>stxB</i> <sub>1</sub> N.º 1, usado para generar pMJS49                            |
| 1BC2    | CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGACGAAAAATAAC (SEQ<br>ID NO: 38)                                   | Cebador en la dirección 3' marcado con His de <i>stxB</i> <sub>1</sub> N.º 2, usado para generar pMJS49                            |
| BC3     | GATCGAATTCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG (SEQ ID<br>NO: 39)                                   | Cebador en la dirección 3' marcado con His de <i>stxB</i> <sub>1</sub> N.º 3, usado para generar pMJS49 y pMJS52                   |
| MSAF    | AACCACACCCACCCGGCAGTTATTTTGCAGTTG<br>ATGTCAGAGGG (SEQ ID NO: 40)                      | Usado con MSAR para generar pMJS28, pMJS49A, pMJS49AB, pMJS49AC y pMJS49ABC  |
| MSAR    | ATAACTGCCCGTGGGGTGTGGTTAATCATCAGT<br>AAAGACGTACC (SEQ ID NO: 41)                      | Usado con MSAF para generar pMJS28, pMJS49A, pMJS49AB, pMJS49AC y pMJS49ABC  |
| 96100F  | ACACATATATCAGTGCCAGGTACAACAGCGGTTA<br>CATTGTCTGG (SEQ ID NO: 42)                      | Usado con 96100R para generar pMJS49AB, pMJS49BC y pMJS49ABC   |
| 96100R  | ACCTGGCACTGATATATGTGTAATAATCAGCAAAG<br>CGATAAAAAACA (SEQ ID NO: 43)                   | Usado con 96100F para generar pMJS49AB, pMJS49BC y pMJS49ABC   |
| JCT1F   | GTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAATGTCCGGCAG<br>ATGGAAGAGTCCG (SEQ ID NO: 44)                   | Cebador de la región C N.º 1, usado con JCT1R para generar pMJS49AC, pMJS49BC y pMJS49ABC  |
| JCT1R   | TTCTGGTTGACTCTCTTCATTCAC (SEQ ID NO: 45)  | Cebador de la región C N.º 1, usado con JCT1F para generar pMJS49AC, pMJS49BC y pMJS49ABC  |
| JCT2F   | GGCATTAAACTGAATTGTCATCATCAGGGGGCG<br>CGTTCTGTTCGC (SEQ ID NO: 46)                     | Cebador de la región C N.º 2, usado con JCT2R para generar pMJS49AC, pMJS49BC y pMJS49ABC  |
| JCT2R   | ATGATGACAATTCAGTATTAATGCC (SEQ ID NO: 47)   | Cebador de la región C N.º 2, usado con JCT2F para generar pMJS49AC, pMJS49BC y pMJS49ABC  |

| Cebador | Secuencia (5'-3') <sup>a,b</sup>  | Finalidad/ región de homología  |
|---------|---|---|
| 2A51    | AGGAGGACAGCTATGAAGTGTATATTATTTAAAT<br>GGGT (SEQ ID NO: 48)                  | Cebador en la dirección 5' de <i>stxA</i> <sub>2</sub> N.º 1 con secuencia de Shine-Dalgarno optimizada, usado para generar pMJS11 y pMJS52 |
| 2A52    | GATCGGATCCTAAGGAGGACAGCTATGAAGTGTA<br>(SEQ ID NO: 49)                       | Cebador en la dirección 5' de <i>stxA</i> <sub>2</sub> N.º 2 con secuencia de Shine-Dalgarno optimizada, usado para generar pMJS11 y pMJS52 |
| C12B    | GGTGGTGGTGGTCATTATTAACACTGCACTTC (SEQ ID NO: 50)                            | Cebador en la dirección 3' marcado con His de <i>stxB</i> <sub>2</sub> N.º 1, usado para generar pMJS52                                     |
| C22B    | CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCATTATTAAC (SEQ ID NO: 51)                            | Cebador en la dirección 3' marcado con His de <i>stxB</i> <sub>2</sub> N.º 2, usado para generar pMJS52                                     |
| 2dF     | GATCGGATCCCTGGTATCGTATTACTTCAGCC (SEQ ID NO: 52)                            | Usado con 2dR para generar pMJS59   |
| 2dR     | GATCGAATTCCTGCACACTACGAAACCAGC (SEQ ID NO: 53)                              | Usado con 2dF para generar pMJS59   |
| 1Y77SF  | TCAGTGACAGGATTTGTTAACAGGAC (SEQ ID NO: 54)                                  | Usado con 1Y77SR para generar pMJS49ABC*  |
| 1Y77SR  | GTCCTGTTAACAAATCCTGTCACTGATAAATTAT<br>TTCGTCAACAATAAGCCG<br>(SEQ ID NO: 55) | Usado con 1Y77SF para generar pMJS49ABC*  |

<sup>a</sup> Los sitios de enzimas de restricción están subrayados.

<sup>b</sup> Los sitios de codón mutagénico están en negrita.

Se generaron cinco toxinas quiméricas marcadas con His adicionales de un clon de *stx*<sub>1</sub> que contenía codones de seis histidina inmediatamente en la dirección 3' del gen B (Fig. 2A). Las toxinas producidas por estas quimeras contienen una, dos o tres regiones de la subunidad A de Stx2 (denominadas en lo sucesivo regiones A, B y C) que comprenden el epítipo 11E10 putativo del anticuerpo monoclonal en lugar de la secuencia comparable en Stx1. Las regiones A, B y C se refieren a los aminoácidos 42-49 (SEQ ID NO: 1), 96-100 (SEQ ID NO: 2) y 244-259 (SEQ ID NO: 3), respectivamente, de la subunidad A de Stx2. Las cinco toxinas quiméricas preparadas se llamaron: Stx1 +A (que contiene la secuencia de Stx2 A quimérica expuesta en SEQ ID NO: 4), Stx1 +AB (que contiene la secuencia quimérica de Stx2 A expuesta en SEQ ID NO: 5), Stx1 +AC (que contiene la secuencia quimérica de Stx2 A expuesta en SEQ ID NO: 6), Stx1 +BC (que contiene la secuencia quimérica de Stx2 A expuesta en SEQ ID NO: 7) o Stx1 +ABC (que contiene la secuencia quimérica de Stx2 A expuesta en SEQ ID NO: 8).

#### Generación y purificación de Stx1 +ABC convertido parcialmente en toxoide.

La toxina Stx1 +ABC se convirtió parcialmente en toxoide cambiando el resto de tirosina en la posición 77 de la subunidad A a un resto de serina por el protocolo SOE. La mutación Y77S disminuyó la dosis citotóxica al 50 % (CD<sub>50</sub>) para células Vero de 10<sup>6</sup> a 10<sup>2</sup> CD<sub>50</sub> por ml de cultivo inducido. Esta reducción de 4 log en la citotoxicidad después de introducirse la mutación Y77S es similar a aquella que ha sido previamente informada para la mutación Y77S en Stx1 (Deresiewicz et al. (1992) Biochemistry 31:3272-3280).

El toxoide Stx1 +ABC se purificó con una columna de afinidad por níquel como se describió previamente (Smith et al. (2006) Infect. Immun. 74:6992-6998). La concentración de toxoide se determinó por el ensayo de ácido bicinonónico (Pierce, Rockford, IL). Una tinción con plata de un gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida reveló que las subunidades A y B del toxoide quimérico fueron las dos bandas principales presentes, aunque se observaron otras bandas menores (datos no mostrados).

#### Construcción de clones de variante de Stx2c y Stx2d.

Se creó por PCR un clon que expresó Stx2c marcado con His como se describió previamente para Stx2 (Robinson et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 103:9667-9672). Se generó el clon *stx*<sub>2d</sub> por PCR a partir EH250 de *E. coli* con cebadores 2DF y 2DR (Pierard et al. (1998) J. Clin. Microbiol. 36:3317-3322). El producto de PCR se ligó en el vector de expresión pTrcHis2 C. Que *stx*<sub>2c</sub> y *stx*<sub>2d</sub> se amplificaron correctamente se confirmó por análisis de secuencia.

### Análisis de transferencia Western

Se sometieron Stx1, Stx2 purificadas, o lisados sónicos de bacterias que expresaron toxinas quiméricas Stx1/Stx2, a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y entonces se examinaron por transferencia Western como se describió previamente (Smith et al., arriba). Las concentraciones de las subunidades A en lisados sónicos que contenían Stx1, Stx2, o las toxinas quiméricas, se estimaron del siguiente modo. Primero, se determinaron diluciones específicas de anticuerpos policlonales de conejo anti-Stx1 y de conejo anti-Stx2 que detectaron las subunidades A purificadas de Stx1 o Stx2, respectivamente, para niveles relativamente equivalentes mediante el uso del software NIH Imagen J, <http://rsb.info.nih.gov/nih-imagen>. Segunda, se separaron los lisados sónicos que contenían la quimera por SDS-PAGE, los geles resultantes se transfirieron entonces a nitrocelulosa, y aquellas transferencias se sondaron entonces con una mezcla de anticuerpos policlonales de conejo anti-Stx1 y de conejo anti-Stx2 diluida como se determinó anteriormente. Tercero, las bandas que se correspondieron con las subunidades A quiméricas en cada carril se cuantificaron con el programa NIH Imagen J para determinar la concentración de toxina en cada muestra de lisado. Cuarto, se cargaron dos geles de poli(acrilamida adicionales con muestras de Stx1, Stx2 purificadas o de los lisados que contenían la quimera normalizada para contener concentraciones equivalentes (como se determinó de la etapa 3). Las preparaciones de toxina se sometieron entonces a SDS-PAGE seguido de análisis de transferencia Western con una mezcla de anticuerpos policlonales de conejo anti-Stx1 y de conejo anti-Stx2 (Figura 1B panel superior) (transferencia 1) o anticuerpo monoclonal 11E10 (Figura 1B panel inferior) (transferencia 2). Los anticuerpos secundarios usados en estas Western fueron inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante [(HRP) Bio-Rad, Hercules, CA] a una dilución de 1:15.000 para la transferencia 1 (Figura 1B panel superior) y IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP (Bio-RAD, Hercules, CA) a una dilución de 1:3.000 para la transferencia 2 (Figura 1B panel inferior). Los anticuerpos secundarios unidos se detectaron por quimioluminiscencia con el kit de detección de transferencia Western ECL-Plus (Amersham Bioscience, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

También se realizaron transferencias Western en lisados sónicos de clones que expresaron Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2d<sub>act</sub> o Stx2e. Primero, la concentración de las subunidades A de estas muestras de toxina se determinó como se ha descrito anteriormente, excepto que solo se usaron anticuerpos policlonales anti-Stx2 de conejo como sonda. Entonces se cargaron dos geles de poli(acrilamida adicionales con cantidades equivalentes de las muestras normalizadas, y se realizaron transferencias Western con tanto anticuerpos policlonales de conejo anti-Stx2 o el anticuerpo monoclonal 11E10 como anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios y el método de detección fueron los mismos que se han descrito anteriormente.

### Ensayos de neutralización *in vitro* en células Vero.

Se llevaron a cabo ensayos de neutralización *in vitro* de lisados sónicos de bacterias que contenían Stx1, Stx2, las toxinas quimérica Stx1/Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2d<sub>act</sub>, o Stx2e con 11E10 en células Vero (ATCC, Manassas, VA) como se describió previamente (Marques et al. (1986) J Infect. Dis. 154:338-341; Smith et al., arriba). En resumen, se mezclaron juntos volúmenes iguales de muestras que contenían toxina (una con respecto a tres CD<sub>50</sub>) en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) y anticuerpo monoclonal 11E10 purificado (0,5 mg/ml) en EMEM y se incubaron durante 2 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. La mezcla toxina-anticuerpo se superpuso sobre células Vero subconfluentes en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 48 h. Entonces se fijaron las células Vero, se tiñeron, y se determinó la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>). Estos experimentos de neutralización se hicieron al menos dos veces por duplicado. La capacidad del anticuerpo monoclonal 11E10 para neutralizar el efecto citotóxico de la toxina en los lisados sónicos se determinó comparando la viabilidad celular en pocillos en los que se añadieron toxina sola o toxina y anticuerpo. El porcentaje de neutralización de las toxinas por el anticuerpo se calculó por la siguiente fórmula. Porcentaje neutralización:  $[(DO_{600} \text{ promedio de toxina} + \text{ pocillos de anticuerpo} - DO_{600} \text{ promedio de pocillos solo con toxina}) / (DO_{600} \text{ promedio de pocillos solo de células} - DO_{600} \text{ promedio de pocillos solo de toxina})] \times 100$ . El anticuerpo monoclonal 11E10 neutralizó Stx2 a aproximadamente el 65 % de actividad no mutante. Para facilitar comparar el porcentaje de niveles de neutralización de los derivados de toxina por el anticuerpo monoclonal 11E10, los datos se normalizaron de forma que la cantidad de neutralización de Stx2 por 11E10 se estableció al 100 %, y los niveles de neutralización de las otras toxinas se calcularon con respecto a los de Stx2.

### Inmunización y exposición de ratones

Se recogieron sueros preinmunes de ratones macho CD-1 que pesaban 14-16 g (Charles River Laboratories, Boston, MA). Estas muestras de suero se usaron en ensayo de inmunoenzimático de adsorción (ELISA) para determinar si los ratones tenían títulos pre-existentes para Stx1 o Stx2. Ninguno de los ratones mostró una respuesta inmunitaria a ninguna toxina al inicio del estudio. Los ratones se dividieron entonces en dos grupos: un grupo inoculado con vector vacío (denominado en lo sucesivo grupo de control negativo) y un grupo que se inmunizó con el toxoide quimérico. Los ratones en el grupo de control negativo se inmunizaron por vía intraperitoneal con una mezcla de PBS y TiterMax, un adyuvante de agua en aceite (TiterMax, USA Inc., Norcross, GA). El segundo grupo de ratones se inmunizó por vía intraperitoneal con 1 µg de toxoide mezclado con TiterMax. Los ratones se reforzaron a intervalos de 3 semanas durante un total de cuatro refuerzos. Dos semanas después del último refuerzo, cinco ratones de control negativo y cinco ratones inmunizados con toxoide se expusieron por vía intraperitoneal a 10 veces el 50 % de dosis letal (DL<sub>50</sub>) de Stx1 (1,250 ng), y 29 ratones de control negativo y 34 ratones inmunizados con toxoide se expusieron a 5 DL<sub>50</sub> de Stx2 (5 ng).

### Síntesis *in vitro* de ensayos de inhibición de proteínas.

Se compraron lisado de reticulocitos de conejo, ARNm de luciferasa de luciérnaga y sustrato de luciferina de Promega Corporation (Madison, WI). Se combinó Stx2 (4 ng/ $\mu$ l) con un volumen igual de anticuerpo (a 4 o 40 ng/ $\mu$ l), y se combinó 1  $\mu$ l de la mezcla toxina/anticuerpo con 9  $\mu$ l de lisado de reticulocitos. La mezcla se incubó a 30 °C para permitir que la toxina inactivara ribosomas en el lisado. Después de 1 hora, se añadió una alícuota de ARNm de luciferasa y aminoácidos que habían sido calentados a 70 °C durante 2 min, y la disolución se incubó durante 90 min adicionales para permitir que avanzara la síntesis *in vitro* de proteínas. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. Se midió actividad de luciferasa añadiendo 1  $\mu$ l de la mezcla de lisado a 20  $\mu$ l de sustrato de luciferina en placas de 96 pocillos claras (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Se detectó emisión de luz bioluminiscente con un Kodak Imagen Station 440CF en una exposición de 10 min. Se analizó señal luminiscente por suma de intensidad de señal total dentro de un área circular que se correspondió con un único pocillo.

### Localización de 11E10 en células intoxicadas

Se sembraron células Vero en portaobjetos de cultivo de tejido de 8 portaobjetos (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml y se dejó que se adhirieran durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Se mezcló Stx2 (0,2 ml de 10 ng/ml) con 10 ng de anticuerpo monoclonal 11E10 purificado o con PBS como control negativo. El anticuerpo/toxina o las disoluciones de PBS/toxina se incubaron con células Vero durante 6 h, y luego las células se fijaron con formalina tamponada (Formalde-Fresh, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y se permeabilizaron con 0,001 % de Triton-X100 (Pierce, Rockford, IL) en PBS. Todos los procedimientos de inmunotinción se hicieron en PBS con 3 % de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma, St. Louis MO). La presencia de anticuerpo monoclonal 11E10 dentro de las células se detectó con IgG de burro anti-ratón con Alexa-Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se marcó Stx2 total dentro de las células intoxicadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-Stx2 marcados y se usó IgG de burro anti-conejo conjugada con Alexa-Fluor 488 como anticuerpo secundario (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se llevó a cabo marcado doble con Stx2 y endosoma con anticuerpo monoclonal anti-Stx2 11F11 (Perera et al., arriba), BEI Resources, Manassas, VA) y anticuerpos policlonales de cabra anti-EEA1 (C-15) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), respectivamente, y anticuerpos secundarios marcados con Alexa-Fluor. Después de la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios apropiados, las células se fijaron con formalina durante 20 min a 37 °C, y los portaobjetos se montaron con medio SlowFade (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se obtuvieron imágenes a 40x aumentos de los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforo unidos mediante un microscopio Olympus con accesorio de fluorescencia de luz reflejada y una cámara digital Spot CCD (Diagnostic Instrument Products, Sterling Heights, MI). Se procesaron las imágenes de fluorescencia y se colocaron con Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

### Resultados

#### Interacción de toxinas quiméricas iniciales con anticuerpo monoclonal 11E10.

Para determinar la porción de Stx2 que interacciona con el anticuerpo monoclonal 11E10, los presentes inventores construyeron un conjunto inicial de seis operones de toxina quimérica que contenían diferentes regiones del gen *stxA*<sub>2</sub> insertadas en lugar de la región correspondiente de *stxA*<sub>1</sub> (Fig. 1A). Se sondaron transferencias Western de Stx1, Stx2 purificadas, o lisados de DH5 $\alpha$  de *E. coli* que expresaban una de las seis toxinas Stx1/Stx2 quiméricas diferentes con el anticuerpo monoclonal 11E10. El anticuerpo reaccionó fuertemente con Stx2 y las toxinas quiméricas que contenían los aminoácidos de las siguiente regiones de la subunidad A de Stx2 : 29-297, 1-158 y 29-128 (Fig. 1B). La toxina quimérica con la porción mínima de Stx2 que era todavía reconocida por 11E10, aunque débilmente, solo contuvo ocho aminoácidos de StxA<sub>2</sub>, región 42-49.

A continuación, se examinó la capacidad del anticuerpo monoclonal 11E10 para neutralizar la toxicidad de lisados bacterianos que contenían Stx1, Stx2, o una de las seis toxinas quiméricas iniciales para las células Vero. Como era de esperar, el anticuerpo monoclonal 11E10 neutralizó Stx2, pero no neutralizó Stx1 (Fig. 1C). Sin embargo, las toxinas híbridas con la región 1-158 o 29-297 de StxA<sub>2</sub> fueron aproximadamente el 85 % neutralizadas por 11E10 en comparación con Stx2, un resultado que sugirió que componentes importantes del epítipo 11E10 se encuentran entre los restos 29-158 de Stx2. A diferencia, la toxina quimérica con los aminoácidos 29-128 de Stx2 fue fuertemente reconocida en la inmunotransferencia, pero solo fue neutralizada a aproximadamente el 32 % del nivel de Stx2. Juntos estos hallazgos sugieren que el epítipo neutralizante de 11E10 engloba un mayor número de aminoácidos que se requieren para la unión de 11E10 a Stx1(2A<sub>29-128</sub>) en una transferencia Western y, por tanto, que falta una porción del epítipo neutralizante de este híbrido. Las otras tres toxinas quiméricas que fueron débilmente detectadas por el anticuerpo monoclonal 11E10 en el análisis de transferencia Western no fueron apreciablemente neutralizadas por 11E10 (menos del 15 %) cuando se compararon con el nivel normalizado de neutralización de Stx2. Tomados conjuntamente, estos resultados indican que uno o más componentes clave del epítipo neutralizante 11E10 en Stx2 existen fuera de los aminoácidos 29-76.

### **Análisis de diferencias entre las secuencias de subunidad A de Stx1 y Stx2 de aminoácidos y estructuras cristalinas.**

La transferencia Western y los análisis de neutralización del primer conjunto de toxinas quiméricas indicó que el epítipo 11E10 requirió al menos los aminoácidos 42-49 de la subunidad A de Stx2 (SEQ ID NO: 1) para la detección de toxinas, pero también reveló que se necesitaron aminoácidos adicionales para el reconocimiento completo y la neutralización de toxinas. Por tanto, se alinearon las secuencias de aminoácidos de las subunidades A maduras de Stx1 y Stx2 para identificar estiramientos únicos adicionales de aminoácidos que podrían participar en el reconocimiento y la neutralización de Stx2 por 11E10. A continuación, se compararon las estructuras cristalinas de Stx (Fraser et al. (1994), arriba) y Stx2 (Fraser et al. (2004), arriba) (números de acceso de Protein Data Bank 1RQ4 y 1R4P, respectivamente) usando el visualizador Deep View/Swiss-PDB para evaluar la localización de regiones de diferencias de secuencias entre las toxinas en las estructuras tridimensionales y la proximidad de tales regiones entre sí. Como se estableció antes, los ocho aminoácidos que abarcan los restos 42-49 en la subunidad A de Stx2 forman parte del sitio de unión de 11E10 y se denominan en lo sucesivo región A o SEQ ID NO: 1 (Fig. 2A; aminoácidos de la región A subrayados). Cuando los ocho aminoácidos de la región A se visualizaron en el contexto de la estructura cristalina de Stx2, pareció que formaban una curva importante en la estructura de la toxina (como se indica en verde y por una flecha negra en la Fig. 2B y también como se indica en la Fig. 2C) y, además, se encontraron en la cara externa de Stx2, cerca de la hendidura de sitio activo alrededor del aminoácido 167.

Se identificó una segunda área disimilar entre las subunidades A de Stx1 y Stx2 cuando se compararon las secuencias de aminoácidos y las estructuras cristalinas de estas dos toxinas, un segmento que los presentes inventores llamaron la región B o SEQ ID NO: 2 (véase la Fig. 2A; aminoácidos de la región B subrayados). La región B abarca cinco residuos en la subunidad A de Stx2 (<sub>96</sub>THISV<sub>100</sub>) (SEQ ID NO: 2) y cuatro de los cinco aminoácidos en esta región se diferencian entre Stx1 y Stx2 (Fig. 2A). Aunque la región B está alejada aproximadamente 50 aminoácidos de la región A, esta porción de aminoácidos se extiende hacia la región A en la estructura cristalina de Stx2 (la región B se indica en azul y por una flecha gris en la Fig. 2B). La estrecha proximidad de la región A con respecto a la región B en una estructura tridimensional es incluso más evidente en un modelo de espacio lleno (Fig. 2C).

La tercera área disimilar entre las subunidades A de Stx1 y Stx2, que los presentes inventores llamaron la región C o SEQ ID NO: 3, se solapa con el sitio de escisión de furina alrededor del resto 246 de Stx2 (véase Fig. 2A; aminoácidos de la región C subrayados). La región C se identificó no solo debido a las diferencias de secuencia de aminoácidos entre Stx1 y Stx2 en esa localización, sino también debido a que la comparación de las estructuras cristalinas de Stx y Stx2 indicó que la región C (como se indica en cian y por una flecha blanca en la Fig. 2C) estaba en proximidad espacial a las regiones A y B. A partir de los análisis de los presentes inventores de las estructuras cristalinas de Stx y Stx2 los presentes inventores llegaron a la conclusión de que las regiones A, B y C se agrupan en la misma cara de Stx2 relativamente cerca del sitio activo catalítico (como se observa mejor en la Fig. 2C).

### **Interacción de toxinas quiméricas de segunda generación con anticuerpo monoclonal 11E10.**

Para determinar si las regiones B y C fueron parte del epítipo 11E10, los presentes inventores produjeron un segundo conjunto de toxinas quiméricas que contuvieron diversas combinaciones de las regiones A, B o C de Stx2 en lugar de las regiones correspondientes en Stx1 (Fig. 3A). A continuación, se sondaron las transferencias Western de Stx1, Stx2 o las toxinas quiméricas con 11E10 (Fig. 3B, panel inferior). El anticuerpo monoclonal 11E10 detectó todas las toxinas que contenían la región A (Stx2, Stx1 +A, Stx1 +AB, Stx1 +AC y Stx1 +ABC) (Fig 3B, panel inferior). No se detectaron las toxinas que faltaban de la región A por el anticuerpo monoclonal 11E10 (Stx1 y Stx1 +BC), un hallazgo que confirma que la región A es un componente esencial del epítipo 11E10. Sin embargo, las dos toxinas quiméricas que incorporaron las regiones A y B (Stx1 +AB o Stx1 +ABC) parecieron ser más fuertemente detectadas por el anticuerpo monoclonal 11E10 que las toxinas quiméricas que incluyeron la región A sola o la región A combinada con C (Fig. 3B, panel inferior). Conjuntamente, estos resultados indican que ambas regiones A y B son importantes para el reconocimiento de 11E10 completo de la toxina.

Los presentes inventores ensayaron a continuación lisados sónicos de cada una de las cinco toxinas quiméricas de segunda generación (Fig. 3A) para la neutralización *in vitro* por el anticuerpo monoclonal 11E10. El anticuerpo neutralizó la toxina quimérica que contenía las regiones A, B y C (Stx1 +ABC) a aproximadamente el 65 % del nivel de neutralización de Stx2. A diferencia, las toxinas quiméricas que contenían solo las regiones A y B (Stx1 +AB) o A y C (Stx1 +AC) se neutralizaron a aproximadamente la mitad del nivel de neutralización de la quimera Stx1 +ABC, (Fig. 3C). No se observó neutralización apreciable por 11E10 contra las toxinas quiméricas Stx1 +A o Stx1 +BC (aproximadamente 6,9 y 4,3 % respectivamente). Como la neutralización más amplia (> 50 %) de las toxinas quiméricas requirió las regiones A, B y C de Stx2, los presentes inventores llegaron a la conclusión de que las tres regiones (A, B y C) son necesarias para > 50 % de neutralización por 11E10.

### **Transferencia Western y resultados del ensayo de neutralización *in vitro* con Stx2 y variantes de Stx2 y el anticuerpo monoclonal 11E10.**

Para determinar cuál de las variantes de Stx2 podría ser reconocida y/o neutralizada por 11E10, Stx1, Stx2, o las variantes de Stx2 (Stx2c, Stx2d, Stx2d<sub>act</sub> y Stx2e) se analizaron por transferencia Western. Stx2 y todas las variantes

de Stx2 fueron reconocidas por 11E10, aunque Stx2e se detectó a un grado mucho menor (Fig. 4A, panel inferior). Esta débil detección de Stx2e por 11E10 en el formato de transferencia Western está de acuerdo con el informe previo de los presentes inventores de que 11E10 fue incapaz de detectar cepas productoras de Stx2e por transferencia de colonias (Perera et al., arriba). Stx2e tiene dos diferencias de aminoácidos conservativas en la región B en comparación con Stx2 (AHISL (SEQ ID NO: 19) en vez de THISV (SEQ ID NO: 2)). También hay varias diferencias de secuencia de aminoácidos inmediatamente adyacentes a la región A (no mostrada). Los presentes inventores conjeturan que estas diferencias pueden ser responsables del reducido reconocimiento de Stx2e por 11E10 en transferencia Western.

Quando se evaluó la capacidad de neutralización del anticuerpo monoclonal 11E10 para las toxinas de variante de Stx2, los presentes inventores encontraron que 11E10 neutralizó todas las toxinas de variante de Stx2 a más de o igual al 60 % del nivel de neutralización de Stx2 (Fig. 4B). Los presentes inventores estuvieron sorprendidos al nivel de neutralización observado por 11E10 de Stx2e debido al reconocimiento limitado de Stx2e por 11E10 en el formato de transferencia Western (Fig. 4A, panel inferior). Sin embargo, la neutralización de Stx2e por 11E10 en este estudio está de acuerdo con el resultado previo de los presentes inventores que mostró que 11E10 neutraliza parcialmente Stx2e (Perera et al., arriba).

### Respuesta inmunitaria y protectora del toxoide Stx1 +ABC en ratones.

Los presentes inventores buscaron a continuación determinar si un derivado convertido en toxoide de la molécula híbrida Stx1 +ABC podría provocar una respuesta neutralizante de suero o protectora a Stx2 en ratones. Se inmunizaron grupos de ratones con el toxoide quimérico o PBS como control. Entonces se evaluaron suero de cinco ratones inmunizados con toxoide y cinco ratones inmunizados con PBS para una respuesta neutralizante anti-Stx1. Ninguno de los sueros de los ratones inmunizados con PBS contuvo actividad neutralizante de Stx1. Como era de esperar de estudios previos, los cinco ratones inmunizados con toxoide tuvieron anticuerpos neutralizantes de Stx1 (Smith et al. (2006) Vaccine 24:4122-4129, Wen et al., arriba). El título de neutralización de anti-Stx1 medio para el suero de estos cinco ratones fue  $4,0 \pm 0,9$  logaritmos por encima de la señal de fondo. Once de los sueros de los 34 ratones restantes inmunizados con toxoide tuvieron alguna respuesta neutralizante a Stx2, mientras que ninguno de los sueros de los 29 ratones inmunizados con PBS presentó alguna respuesta anti-Stx2 (datos no mostrados).

Dos semanas después del refuerzo final, cinco ratones de control negativo y cinco ratones inmunizados con toxoide se expusieron por vía intraperitoneal a  $10 \text{ DL}_{50}$  de Stx1. Todos los ratones de control negativos murieron mientras que todos los ratones inmunizados con toxoide sobrevivieron a la exposición letal (Tabla 3), como se predijo a partir de los resultados de un estudio previo (Smith et al., arriba, Wen et al., arriba). Además, la supervivencia de los ratones inmunizados con toxoide que se expusieron a Stx1 se correlacionó directamente con los títulos neutralizantes *in vitro* de aquellos ratones.

**Tabla 3. Protección de ratones inmunizados contra una exposición letal con Stx1 o Stx2.**

| Grupo | Ratones inmunizados con: | Ratones expuestos a $10 \text{ DL}_{50}^{\text{ab}}$ de: | Número de ratones supervivientes/ número total de ratones (porcentaje de supervivencia) |
|-------|--------------------------|--|---|
| A     | PBS                      | Stx1   | 0/5   |
| B     | Toxoide Stx1 +ABC        | Stx1   | 5/5   |
| C     | PBS                      | Stx2   | 6/29 (20,7 %)   |
| D     | Toxoide Stx1 +ABC        | Stx2   | 12/34 (35,3 %) <sup>c</sup>   |

<sup>a</sup> La  $\text{DL}_{50}$  se determinó previamente que era 125 y 1 ng/ratón para Stx1 y Stx2, respectivamente.

<sup>b</sup> El peso promedio de los ratones cuando se expusieron era 47,1 g.

<sup>c</sup> Se usó la prueba exacta de Fisher para comparar las proporciones que sobrevivieron en los grupos C y D y el valor de p fue 0,2667.

Debido a que se observaron bajos títulos de anticuerpo neutralizante dirigido contra Stx2 en el grupo tratado con toxoide, los presentes inventores eligieron exponer el resto de los ratones a solo  $5 \text{ DL}_{50}$  de Stx2. Seis de los 29 ratones de control negativos (20,7 %) sobrevivieron a la exposición a Stx2, mientras que 12 de los 34 ratones inmunizados con toxoide (35,3 %) sobrevivieron (Tabla 3), un hallazgo que, aunque no es estadísticamente significativo, sugiere que el toxoide quimérico puede haber proporcionado alguna protección de Stx2.

### Síntesis *in vitro* del ensayo de inhibición de proteínas.

El hallazgo de los presentes inventores de que el epítipo 11E10 pareció consistir en bucles superficiales alrededor de la hendidura del sitio activo de Stx2 les condujo a la hipótesis de que 11E10 podría neutralizar Stx2 bloqueando la

capacidad de la toxina para inhibir la síntesis de proteínas. Por tanto, los presentes inventores evaluaron si el anticuerpo monoclonal 11E10 podría neutralizar los efectos de inactivación del ribosoma de Stx2 en una síntesis de reticulocitos de conejo del ensayo de proteínas al que se añadió ARNm de luciferasa. Se eligió una concentración de toxina que disminuyó la señal de la proteína indicadora de luciferasa aproximadamente el 60 % en comparación con la señal medida cuando no se añadió toxina (Fig. 5). La adición de 11E10 al ensayo permitió que se produjera la síntesis de proteínas en el lisado de reticulocitos de conejo incluso cuando Stx2 estuvo presente, pero no el anticuerpo irrelevante del mismo isotipo (Fig. 5).

### El anticuerpo monoclonal 11E10 altera la distribución global de Stx2 en células Vero

Aunque los presentes inventores encontraron que el anticuerpo monoclonal 11E10 previno la inhibición de la síntesis de proteínas por Stx2 en el ensayo de síntesis de proteínas *in vitro*, los presentes inventores supusieron además que 11E10 puede prevenir que Stx2 llegue a los ribosomas en el citoplasma de células Vero intoxicadas. Los presentes inventores, por tanto, buscaron determinar si el anticuerpo monoclonal 11E10 alteraba la localización de Stx2 en células diana (los presentes inventores encontraron previamente que Stx2 unido a 11E10 podría unirse a células Vero y que 11E10 podría unirse a Stx2 unida a células Vero (datos no mostrados)). Stx2 se mezcló con 11E10 o PBS y la mezcla de anticuerpo/toxina o PBS/toxina se incubó con células Vero. La distribución de Stx2 en las células diana se visualizó entonces con anticuerpos policlonales de conejo anti-Stx2 y un anticuerpo secundario IgG anti-conejo marcado con fluoróforo (Fig. 6). Stx2 pareció estar distribuido en todo el citoplasma en ausencia de 11E10 (Fig. 6A), pero pareció quedar concentrado en cuerpos en gran parte perinucleares en presencia de 11E10 (Fig. 6B). Cuando las células incubadas con la mezcla de toxina/11E10 se tiñeron con IgG anti-ratón, 11E10 se observó en las mismas estructuras punteadas perinucleares que Stx2 (Fig. 6C). El anticuerpo monoclonal 11E10 fue incapaz de entrar en las células en ausencia de toxina (Fig. 6D). La localización de Stx2 unida a 11E10 dentro de cuerpos punteados alrededor del núcleo sugirió que el complejo de anticuerpo-toxina entró en la célula pero no circuló en el citoplasma. Los presentes inventores, por tanto, preguntaron si Stx2 o Stx2 unida a 11E10 estaban localizadas en endosomas tempranos por inmunotinción de las células intoxicadas con el anticuerpo monoclonal marcador de endosomas temprano EEA-1. Los presentes inventores encontraron que demasiada Stx2 en células intoxicadas con Stx2 unida a 11E10 se colocalizó con el marcado de endosoma temprano (Fig 6E-G), como se muestra por un color amarillo-naranja cuando los patrones de tinción se solaparon. A diferencia, cuando las células Vero se incubaron con Stx2 sola, se encontró la toxina en todo el citoplasma y solo una pequeña cantidad se colocalizó con el marcador de endosoma temprano (Fig 6H-J).

### Discusión

Los resultados de los presentes inventores demuestran que el epítipo 11E10 del anticuerpo monoclonal es conformacional e incluye tres regiones no lineales en la subunidad A de Stx2 que parecen próximas al sitio activo de la toxina en la estructura cristalina (véase Fig. 2C). La estrategia de los presentes inventores para identificar el epítipo 11E10 implicó la generación de toxinas quiméricas Stx1/Stx2 y se basó en la suposición de que el poner secuencias de Stx2 sobre el esqueleto de Stx1 mantendría la estructura terciaria tridimensional del epítipo del anticuerpo y permitiría el reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 11E10. Los presentes inventores encontraron la región mínima de la evaluación de laboratorio en curso de la versión humanizada de 11E10, *caStx2*, en la que se ha completado la prueba de seguridad de fase I (Dowling et al., arriba).

Los presentes inventores intentaron proteger ratones de la exposición a Stx2 por inmunización con la molécula de Stx1 quimérica convertida en toxoide que solo contenía los 29 aminoácidos de Stx2 que comprendían el epítipo 11E10. Los presentes inventores encontraron que aunque los ratones inmunizados produjeron una respuesta protectora a Stx1, solo algunos de los ratones generaron anticuerpos neutralizantes de Stx2, y estos fueron de título bajo. La respuesta a Stx2 puede haber sido mejorada con refuerzos adicionales del toxoide quimérico.

Los presentes inventores encontraron que 11E10 bloqueó la actividad enzimática de Stx2 *in vitro*, un hecho que los presentes inventores predijeron basándose en la estrecha proximidad del epítipo 11E10 al sitio activo de la toxina. Los presentes inventores observaron además que 11E10 alteró la distribución global de la toxina dentro de la célula, un hallazgo que es similar a los datos sobre la neutralización de Stx2 por un anticuerpo monoclonal dirigido contra StxA2 diferente, 5C12, como se informa por Krautz-Peterson et al. ((2008) *Infect. Immun.* 76:1931-1939). Estos investigadores llegaron a la conclusión de que cuando el anticuerpo monoclonal 5C12 se une a StxA2, altera el patrón de tráfico intracelular de la toxina (Krautz-Peterson et al, arriba). Los datos de los presentes inventores indican que una vez el complejo 11E10/Stx2 se une a y entra en la célula huésped, el anticuerpo puede prevenir la circulación de toxina a los ribosomas diana en el citosol. Sin embargo, como los presentes inventores demostraron que 11E10 previno la función enzimática de la toxina *in vitro*, los presentes inventores predicen que si la subunidad A de Stx2 complejada con 11E10 alcanza su diana enzimática en el citosol, la toxina sería incapaz de destruir la célula.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> The Henry M. Jackson Foundation For The Advancement of Military Medicine, Inc.

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES BASADAS EN PROTEÍNA TIPO 2 DE LA TOXINA SHIGA

5 <130> 50111/117WO3

<160> 55

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

20

**Asn His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr**  
**1 5**

<210> 2

<211> 5

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

30

<400> 2

**Thr His Ile Ser Val**  
**1 5**

35

<210> 3

ES 2 614 803 T3

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 3

10           Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu  
              1                           5                           10                           15

<210> 4

<211> 315

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20 <400> 4

ES 2 614 803 T3

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe  
1 5 10 15

Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala  
20 25 30

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr  
35 40 45

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asn  
50 55 60

His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp  
65 70 75 80

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn  
85 90 95

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
100 105 110

Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
115 120 125

Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
130 135 140

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
145 150 155 160

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
165 170 175

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
180 185 190

Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser  
195 200 205

Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn  
210 215 220

ES 2 614 803 T3

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser  
 225 230 235 240

Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly  
 245 250 255

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala  
 260 265 270

Arg Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg  
 275 280 285

Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu  
 290 295 300

Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser  
 305 310 315

<210> 5

<211> 315

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 5

ES 2 614 803 T3

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe  
 1 5 10 15

Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala  
 20 25 30

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr  
 35 40 45

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asn  
 50 55 60

His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp  
 65 70 75 80

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn  
 85 90 95

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr

ES 2 614 803 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Arg | Phe | Ala | Asp | Phe | Thr | His | Ile | Ser | Val | Pro | Gly | Thr | Thr | Ala | Val |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Thr | Leu | Ser | Gly | Asp | Ser | Ser | Tyr | Thr | Thr | Leu | Gln | Arg | Val | Ala | Gly |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Gly | Met | Gln | Ile | Asn | Arg | His | Ser | Leu | Thr | Thr | Ser |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Tyr | Leu | Asp | Leu | Met | Ser | His | Ser | Gly | Thr | Ser | Leu | Thr | Gln | Ser | Val |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ala | Arg | Ala | Met | Leu | Arg | Phe | Val | Thr | Val | Thr | Ala | Glu | Ala | Leu | Arg |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Phe | Arg | Gln | Ile | Gln | Arg | Gly | Phe | Arg | Thr | Thr | Leu | Asp | Asp | Leu | Ser |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Gly | Arg | Ser | Tyr | Val | Met | Thr | Ala | Glu | Asp | Val | Asp | Leu | Thr | Leu | Asn |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Trp | Gly | Arg | Leu | Ser | Ser | Val | Leu | Pro | Asp | Tyr | His | Gly | Gln | Asp | Ser |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Val | Arg | Val | Gly | Arg | Ile | Ser | Phe | Gly | Ser | Ile | Asn | Ala | Ile | Leu | Gly |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Ser | Val | Ala | Leu | Ile | Leu | Asn | Cys | His | His | His | Ala | Ser | Arg | Val | Ala |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Arg | Met | Ala | Ser | Asp | Glu | Phe | Pro | Ser | Met | Cys | Pro | Ala | Asp | Gly | Arg |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |  |
| Val | Arg | Gly | Ile | Thr | His | Asn | Lys | Ile | Leu | Trp | Asp | Ser | Ser | Thr | Leu |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Gly | Ala | Ile | Leu | Met | Arg | Arg | Thr | Ile | Ser | Ser |     |     |     |     |     |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     |     |  |

<210> 6

<211> 315

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 614 803 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 6

5

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe  
 1 5 10 15

Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala  
 20 25 30

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr  
 35 40 45

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asn  
 50 55 60

His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp  
 65 70 75 80

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn  
 85 90 95

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
 100 105 110

Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
 115 120 125

Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 130 135 140

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 145 150 155 160

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
 165 170 175

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
 180 185 190

Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser  
 195 200 205

Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn  
 210 215 220

ES 2 614 803 T3

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser  
 225 230 235 240

Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly  
 245 250 255

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val  
 260 265 270

Arg Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu Cys Pro Ala Asp Gly Arg  
 275 280 285

Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu  
 290 295 300

Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser  
 305 310 315

<210> 7

<211> 315

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 7

ES 2 614 803 T3

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe  
1 5 10 15

Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala  
20 25 30

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr  
35 40 45

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp  
50 55 60

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

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn  
85 90 95

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr

ES 2 614 803 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Arg | Phe | Ala | Asp | Phe | Thr | His | Ile | Ser | Val | Pro | Gly | Thr | Thr | Ala | Val |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Thr | Leu | Ser | Gly | Asp | Ser | Ser | Tyr | Thr | Thr | Leu | Gln | Arg | Val | Ala | Gly |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Gly | Met | Gln | Ile | Asn | Arg | His | Ser | Leu | Thr | Thr | Ser |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Tyr | Leu | Asp | Leu | Met | Ser | His | Ser | Gly | Thr | Ser | Leu | Thr | Gln | Ser | Val |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ala | Arg | Ala | Met | Leu | Arg | Phe | Val | Thr | Val | Thr | Ala | Glu | Ala | Leu | Arg |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Phe | Arg | Gln | Ile | Gln | Arg | Gly | Phe | Arg | Thr | Thr | Leu | Asp | Asp | Leu | Ser |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Gly | Arg | Ser | Tyr | Val | Met | Thr | Ala | Glu | Asp | Val | Asp | Leu | Thr | Leu | Asn |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Trp | Gly | Arg | Leu | Ser | Ser | Val | Leu | Pro | Asp | Tyr | His | Gly | Gln | Asp | Ser |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Val | Arg | Val | Gly | Arg | Ile | Ser | Phe | Gly | Ser | Ile | Asn | Ala | Ile | Leu | Gly |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Ser | Val | Ala | Leu | Ile | Leu | Asn | Cys | His | His | Gln | Gly | Ala | Arg | Ser | Val |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Arg | Ala | Val | Asn | Glu | Glu | Ser | Gln | Pro | Glu | Cys | Pro | Ala | Asp | Gly | Arg |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |  |
| Val | Arg | Gly | Ile | Thr | His | Asn | Lys | Ile | Leu | Trp | Asp | Ser | Ser | Thr | Leu |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Gly | Ala | Ile | Leu | Met | Arg | Arg | Thr | Ile | Ser | Ser |     |     |     |     |     |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     |     |  |

<210> 8

<211> 315

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 614 803 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 8

5

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe  
 1 5 10 15

Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala  
 20 25 30

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr  
 35 40 45

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asn  
 50 55 60

His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp  
 65 70 75 80

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn  
 85 90 95

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
 100 105 110

Arg Phe Ala Asp Phe Thr His Ile Ser Val Pro Gly Thr Thr Ala Val  
 115 120 125

Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 130 135 140

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 145 150 155 160

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
 165 170 175

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
 180 185 190

Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser  
 195 200 205

Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn  
 210 215 220

ES 2 614 803 T3

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser  
225 230 235 240

Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly  
245 250 255

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val  
260 265 270

Arg Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu Cys Pro Ala Asp Gly Arg  
275 280 285

Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu  
290 295 300

Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser  
305 310 315

<210> 9

<211> 1227

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 9

atgaaaataa ttatTTTTtag agtgctaact tttttctttg ttatcttttc agttaatgtg 60  
gtggcgaagg aatttacctt agacttctcg actgcaaaga cgtatgtaga ttcgctgaat 120  
gtcattcgct ctgcaatagg tactccatta cagactatTT catcaggagg tacgtcttta 180  
ctgatgattg atagtggctc aggggataat ttgtttgcag ttgatgtcag agggatagat 240  
ccagaggaag ggcggtttaa taatctacgg cttattgttg aacgaaataa tttatatgtg 300  
acaggatttg ttaacaggac aaataatgTT ttttatcgct ttgctgattt ttcacatgTT 360  
acctttccag gtacaacagc ggttacattg tctggtgaca gtagctatac cacgttacag 420  
cgtgttgtag ggatcagtcg tacggggatg cagataaatc gccattcgtt gactacttct 480  
tatctggatt taatgtcgca tagtggaaacc tcaactgacgc agtctgtggc aagagcgatg 540  
ttacggtttg ttactgtgac agctgaagct ttacgttttc ggcaaataca gaggggattt 600  
cgtacaacac tggatgatct cagtgggcgt tcttatgtaa tgactgctga agatgttgat 660  
cttacattga actggggaag gttgagtagc gtctgcctg actatcatgg acaagactct 720  
gttcgtgtag gaagaatttc ttttggaagc attaatgcaa ttctgggaag cgtggcatta 780  
atactgaatt gtcacatca tgcacgcga gttgccagaa tggcatctga tgagtttccct 840  
tctatgtgtc cggcagatgg aagagtccgt gggattacgc acaataaaat attgtgggat 900

10

ES 2 614 803 T3

tcatccactc tgggggcaat tctgatgcgc agaactatta gcagttgagg gggtaaaatg 960  
 aaaaaaacat tattaatagc tgcacgcctt tcattttttt cagcaagtgc gctggcgacg 1020  
 cctgattgtg taactggaaa ggtggagtat acaaaatata atgatgacga tacctttaca 1080  
 gttaaagtgg gtgataaaga attatttacc aacagatgga atcttcagtc tcttcttctc 1140  
 agtgcgcaaa ttacggggat gactgtaacc attaaaacta atgcctgtca taatggaggg 1200  
 ggattcagcg aagttatttt togttga 1227

<210> 10

<211> 948

5

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 10

atgaaaataa ttatttttag agtgctaact ttttctttg ttatcttttc agttaatgtg 60  
 gtggcgaagg aatttacctt agacttctcg actgcaaaga cgtatgtaga ttcgctgaat 120  
 gtcattcget ctgcaatagg tactccatta cagactatth catcaggagg tacgtcttta 180  
 ctgatgattg atagtggctc aggggataat ttgtttgcag ttgatgtcag agggatagat 240  
 ccagaggaag ggcggtttaa taatctacgg cttattgttg aacgaaataa tttatatgtg 300  
 acaggatttg ttaacaggac aaataatgtt ttttatcgcct ttgctgattt ttcacatgtt 360  
 acctttccag gtacaacagc ggttacattg tctggtgaca gtagctatac caggttacag 420  
 cgtggtgcag ggatcagtcg tacggggatg cagataaatc gccattcgtt gactacttct 480  
 tatctggatt taatgtcgcg tagtggaacc tcaactgacgc agtctgtggc aagagcgatg 540  
 ttacggtttg ttaactgtgac agctgaagct ttacgttttc ggcaaataca gaggggattt 600  
 cgtacaacac tggatgatct cagtgggcgt tcttatgtaa tgactgctga agatgttgat 660  
 cttacattga actggggaag gttgagtagc gtccctgctg actatcatgg acaagactct 720  
 gttcgtgtag gaagaatttc ttttggaagc attaatgcaa ttctgggaag cgtggcatta 780  
 atactgaatt gtcatcatca tgcacgcgca gttgccagaa tggcatctga tgagtttcct 840  
 tctatgtgtc cggcagatgg aagagtccgt gggattacgc acaataaaat attgtgggat 900  
 tcatccactc tgggggcaat tctgatgcgc agaactatta gcagttga 948

10

<210> 11

<211> 270

<212> ADN

15

<213> Escherichia coli

ES 2 614 803 T3

<400> 11

```
atgaaaaaaaa cattattaat agctgcatcg ctttcatttt tttcagcaag tgcgctggcg      60
acgcctgatt gtgtaactgg aaaggtggag tatacaaaat ataatgatga cgataccttt      120
acagttaaag tgggtgataa agaattattt accaacagat ggaatcttca gtctcttctt      180
ctcagtgcgc aaattacggg gatgactgta accattaata ctaatgcctg tcataatgga      240
gggggattca gcgaagttat ttttcggtga                                         270
```

5

<210> 12

<211> 315

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 12

ES 2 614 803 T3

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe  
1 5 10 15

Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala  
20 25 30

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr  
35 40 45

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp  
50 55 60

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

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn  
85 90 95

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
100 105 110

Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
115 120 125

Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
130 135 140

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
145 150 155 160

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
165 170 175

ES 2 614 803 T3

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
 180 185 190

Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser  
 195 200 205

Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn  
 210 215 220

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser  
 225 230 235 240

Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly  
 245 250 255

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala  
 260 265 270

Arg Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg  
 275 280 285

Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu  
 290 295 300

Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser  
 305 310 315

<210> 13

<211> 89

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 13

ES 2 614 803 T3

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

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

Lys Tyr Asn Asp Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly Asp Lys Glu  
35 40 45

Leu Phe Thr Asn Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Leu Ser Ala Gln  
50 55 60

Ile Thr Gly Met Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly  
65 70 75 80

Gly Gly Phe Ser Glu Val Ile Phe Arg  
85

<210> 14

5 <211> 1241

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 14

10

ES 2 614 803 T3

atgaagtgta tattatttaa atgggtactg tgctgttac tgggtttttc ttcggtatcc 60  
 tattcccggg agtttacgat agacttttcg acccaacaaa gttatgtctc ttcgtaaata 120  
 agtatacggg cagagatata gaccctctt gaacatatat ctcaggggac cacatcggtg 180  
 tctgttatta accacacccc accgggcagt tattttgctg tggatatacg agggcttgat 240  
 gtctatcagg cgcgttttga ccatcttctg ctgattattg agcaaaataa tttatatgtg 300  
 gccgggttcg ttaatacggc aacaaatact ttctaccggt tttcagattt tacacatata 360  
 tcagtgcccg gtgtgacaac ggtttccatg acaacggaca gcagttatac cactctgcaa 420  
 cgtgtcgcag cgctggaacg ttccggaatg caaatcagtc gtcactcact ggtttcatca 480  
 tatctggcgt taatggagtt cagtggtaat acaatgacca gagatgcatc cagagcagtt 540  
 ctgcgttttg tcaactgtcac agcagaagcc ttacgcttca ggcagatata gagagaattt 600  
 cgtcaggcac tgtctgaaac tgctcctgtg tatacgatga cgccgggaga cgtggacctc 660  
 actctgaact gggggcgaat cagcaatgtg ctccggagat atcggggaga ggatggtgtc 720  
 agagtgggga gaatatcctt taataatata tcagcgatac tggggactgt ggccgttata 780  
 ctgaattgcc atcatcaggg ggcgcttct gttcgcgccg tgaatgaaga gagtcaacca 840  
 gaatgtcaga taactggcga caggcctggt ataaaaataa acaatacatt atgggaaagt 900  
 aatacagctg cagcgtttct gaacagaaag tcacagtttt tatatacaac gggtaaataa 960  
 aggagttaag catgaagaag atgtttatgg cggttttatt tgcattagct tctgttaatg 1020  
 caatggcggc ggattgtgct aaaggtaaaa ttgagttttc caagtataat gaggatgaca 1080  
 catttacagt gaaggttgac gggaaagaat actggaccag tcgctggaat ctgcaaccgt 1140  
 tactgcaaag tgctcagttg acaggaatga ctgtcacaat caaatccagt acctgtgaat 1200  
 caggctccgg atttgctgaa gtgcagttta ataatgactg a 1241

<210> 15

<211> 960

5

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 15

ES 2 614 803 T3

atgaagtgta tattatthaa atgggtactg tgccctgttac tgggtttttc ttcggtatcc 60  
tattcccggg agtttacgat agacttttcg acccaacaaa gttatgtctc ttcgthaaat 120  
agtatacggg cagagatatic gaccctctt gaacatatac ctcaggggac cacatcggtg 180  
tctgttatta accacacccc accgggcagt tattttgctg tggatatacg agggcttgat 240  
gtctatcagg cgcgthttga ccatcttctg ctgattattg agcaaaataa thtatatgtg 300  
gccgggttcg ttaatacggc aacaaatact ttctaccgtt tttcagattt tacacatata 360  
tcagtgcccg gtgtgacaac ggtttccatg acaacggaca gcagttatac cactctgcaa 420  
cgtgtcgcag cgcctggaac ttccggaatg caaatcagtc gtcactcact ggtttcatca 480  
tatctggcgt taatggagtt cagtggtaat acaatgacca gagatgcatc cagagcagtt 540  
ctgcgthttg tcaactgtcac agcagaagcc ttacgcttca ggcagataca gagagaattt 600  
cgtcaggcac tgtctgaaac tgctcctgtg tatacgatga cgcggggaga cgtggacctc 660  
actctgaact gggggcgaat cagcaatgtg cttccggagt atcggggaga ggatgggtgc 720  
agagtgggga gaataticctt taataatata tcagcgatac tggggactgt ggccgthata 780  
ctgaattgcc atcatcaggg ggcgcgttct gttcgcgcog tgaatgaaga gagtcaacca 840  
gaatgtcaga taactggcga caggcctgtt ataaaaataa acaatacatt atgggaaagt 900  
aatacagctg cagcgtthct gaacagaaaag tcacagthtt tatatacaac gggthaaata 960

<210> 16

<211> 270

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 16

atgaagaaga tgthtatggc ggtthtattt gcattagctt ctgttaatgc aatggcggcg 60  
gattgtgcta aaggthaaat tgagthttcc aagtataatg aggatgacac atthacagtg 120  
aaggthgacg ggaagaata ctggaccagt cgcctggaatc tgcaaccgtt actgcaaagt 180  
gctcagthga caggaatgac tgtcacaatc aaatccagta cctgtgaaac aggctccgga 240  
thtgctgaag tgcagththaa taatgactga 270

10

<210> 17

<211> 319

<212> PRT

15 <213> Escherichia coli

<400> 17

ES 2 614 803 T3

Met Lys Cys Ile Leu Phe Lys Trp Val Leu Cys Leu Leu Leu Gly Phe  
1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Tyr Ser Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln  
20 25 30

Gln Ser Tyr Val Ser Ser Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr  
35 40 45

Pro Leu Glu His Ile Ser Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn  
50 55 60

His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp  
65 70 75 80

Val Tyr Gln Ala Arg Phe Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln Asn  
85 90 95

Asn Leu Tyr Val Ala Gly Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr  
100 105 110

Arg Phe Ser Asp Phe Thr His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr Val  
115 120 125

Ser Met Thr Thr Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Ala  
130 135 140

Leu Glu Arg Ser Gly Met Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser  
145 150 155 160

Tyr Leu Ala Leu Met Glu Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala  
165 170 175

Ser Arg Ala Val Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
180 185 190

Phe Arg Gln Ile Gln Arg Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr Ala  
195 200 205

Pro Val Tyr Thr Met Thr Pro Gly Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp  
210 215 220

Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val  
225 230 235 240

ES 2 614 803 T3

Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr  
 245 250 255

Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg  
 260 265 270

Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu Cys Gln Ile Thr Gly Asp Arg  
 275 280 285

Pro Val Ile Lys Ile Asn Asn Thr Leu Trp Glu Ser Asn Thr Ala Ala  
 290 295 300

Ala Phe Leu Asn Arg Lys Ser Gln Phe Leu Tyr Thr Thr Gly Lys  
 305 310 315

<210> 18

<211> 89

5

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 18

Met Lys Lys Met Phe Met Ala Val Leu Phe Ala Leu Ala Ser Val Asn  
 1 5 10 15

Ala Met Ala Ala Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr  
 20 25 30

Asn Glu Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Asp Gly Lys Glu Tyr Trp  
 35 40 45

Thr Ser Arg Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr  
 50 55 60

Gly Met Thr Val Thr Ile Lys Ser Ser Thr Cys Glu Ser Gly Ser Gly  
 65 70 75 80

Phe Ala Glu Val Gln Phe Asn Asn Asp  
 85

10

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 19

**Ala His Ile Ser Leu**  
**1 5**

10

<210> 20

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 20

taaggaggac agctatg 17

20

<210> 21

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 21

30

gatcggatcc ccctgtaacg aagtttgcgt aacagc 36

<210> 22

<211> 39

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 22

5 gatcgaattc tcgcttacga tcatcaaaga gatcatacc 39

<210> 23

<211> 38

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 23

gatcggatcc agcaagggcc accatatcac ataccgcc 38

<210> 24

<211> 38

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25 <400> 24

caggggaatt caccatgcga aatttttta acaaatgc 38

<210> 25

30 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Construcción sintética

<400> 25

ES 2 614 803 T3

gaacatatat ctcaggggac cac 23

<210> 26  
<211> 47

5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

10 <400> 26  
gtggccccct gagatatatg ttctaattgga gtacctattg cagagcg 47

<210> 27

15 <211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Construcción sintética

<400> 27  
ttacggtttg ttactgtgac agctgaagc 29

25 <210> 28  
<211> 53  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 28  
gcttcagctg tcacagtaac aaaccgtaaa actgctctgg atgcatctct ggt 53

35 <210> 29  
<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 29

cagataaatc gccattcgtt ga 22

10 <210> 30

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 30

tcaacgaatg gcgatttacc tgattccgg aacgtccag cgc 43

20

<210> 31

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 31

30 ggtacgtctt tactgatgat taaccacacc ccaccgggca gttatttgc 50

<210> 32

<211> 50

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 614 803 T3

<223> Construcción sintética

<400> 32

gcaaaataac tgcccgggtgg ggtgtgggta atcatcagta aagacgtacc 50

5

<210> 33

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 33

15

tatgtgacag gatttgtaa caggac 26

<210> 34

<211> 60

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<400> 34

gtcctgtaa caaatcctgt cacatataaa ttatttgct caataatcag acgaagatgg 60

<210> 35

<211> 39

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

35

<400> 35

aggaggacag ctatgaaat aattatfff agagtgcta 39

49

<210> 36

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 36

10 gatcggatcc taaggaggac agctatgaaa ataatt 36

<210> 37

<211> 34

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20 <400> 37

ggtggtggtg acgaaaaata acttcgctga atcc 34

<210> 38

<211> 32

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

30

<400> 38

cagtggtggt ggtggtggtg acgaaaaata ac 32

<210> 39

35 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 39

5 gatcgaattc tcagtgggtg tgggtggtg g 31

<210> 40

<211> 45

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 40

aaccacaccc caccgggcag ttatttgca gttgatgtca gaggg 45

<210> 41

<211> 45

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<400> 41

ataactgcc ggtgggtgt ggttaatcat cagtaaagac gtacc 45

<210> 42

30 <211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Construcción sintética

<400> 42

ES 2 614 803 T3

acacatatat cagtgccagg tacaacagcg gttacattgt ctgg 44

<210> 43

<211> 46

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 43

acctggcact gatatatgtg taaatcagc aaagcgataa aaaaca 46

<210> 44

15 <211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética

<400> 44

gtgaatgaag agagtcaacc agaatgtccg gcagatggaa gagtccg 47

25 <210> 45

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 45

ttctggttga ctctcttcat tcac 24

35

<210> 46

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 46

ggcattaata ctgaattgct atcatcaggg ggcgcgttct gttcgc 46

10 <210> 47

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 47

atgatgacaa ttcagtatta atgcc 25

20

<210> 48

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 48

30 agggagacag ctatgaagtg tatattattt aatgggt 38

<210> 49

<211> 34

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 49

gatcggatcc taaggaggac agctatgaag tgta 34

5

<210> 50

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 50

15 ggtgggtgtg gtcattatta aactgcactt c 31

<210> 51

<211> 32

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25 <400> 51

cagtggtgtg ggtgggtgtg gtcattatta aa 32

<210> 52

<211> 32

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

35

<400> 52

gatcggatcc ctggtatcgt attactcag cc 32

<210> 53  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> Construcción sintética  
  
<400> 53  
10 gatcgaattc ctgcacacta cgaaaccagc 30  
  
<210> 54  
<211> 26  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Construcción sintética  
  
<400> 54  
20 tcagtgacag gatttgtaa caggac 26  
  
<210> 55  
<211> 53  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Construcción sintética  
30  
  
<400> 55  
gtcctgtaa caaatcctgt cactgataaa ttattcgtt caacaataag ccg 53

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido purificado que comprende:
  - (i) SEQ ID NO: 1;
  - (ii) SEQ ID NOs: 1 y 2; o
  - 5 (iii) SEQ ID NOs: 1, 2 y 3;
 y un armazón de proteína no Stx2, en el que dichas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NOs: 1 y 2, o SEQ ID NOs: 1, 2 y 3 se insertan en dicho armazón de proteína no Stx2 y en el que dicho polipéptido tiene la antigenicidad de Stx2 y en el que dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:8.
- 10 2. El polipéptido purificado de la reivindicación 1, en el que dicho armazón comprende una proteína sustancialmente idéntica a Stx1, o un fragmento de la misma.
3. El polipéptido purificado de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho polipéptido comprende un fragmento que incluye SEQ ID NO:1 y que tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia con los aminoácidos 64-122 de SEQ ID NO: 8.
- 15 4. El polipéptido purificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho polipéptido se convierte en toxoide.
5. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica uno cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector capaz de expresar un polipéptido, comprendiendo dicho vector la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5.
- 20 7. Una célula huésped que contiene el vector de la reivindicación 6.
8. Uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la fabricación de un anticuerpo anti-Stx2 que se une específicamente al epítipo 11E10 de la proteína tipo 2 de toxina Shiga (Stx2), comprendiendo dicho método las etapas de:
  - 25 - inmunizar un mamífero con un polipéptido según una cualquiera de 1 a 4, en el que dicha inmunización comprende opcionalmente además usar un adyuvante;
  - purificar dicho anticuerpo anti-Stx2 que se une específicamente al epítipo 11E10 de la proteína Stx2 de un tejido de dicho mamífero o de un hibridoma preparado usando dicho tejido; y opcionalmente
  - 30 - cribar dicho anticuerpo contra Stx2 y Stx1 en un ensayo de neutralización *in vitro*, en el que un anticuerpo que neutraliza al menos el 50 % del efecto citotóxico de Stx2 es un anticuerpo anti-Stx2 que se une específicamente al epítipo 11E10 de la proteína Stx2.
9. Un anticuerpo anti-Stx2, o fragmento del mismo, que se une específicamente al epítipo 11E10 de la proteína tipo 2 de toxina Shiga (Stx2) que comprende uno cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo inhibe la unión de un anticuerpo 11E10 (ATCC 1907), anticuerpo 11E10 quimérico, o anticuerpo 11E10 humanizado, a dicha proteína Stx2, en el que dicho anticuerpo no es un anticuerpo 11E10, un anticuerpo 11E10 quimérico, o un anticuerpo 11E10 humanizado, en el que dicho epítipo 11E10 es un epítipo conformacional.
- 35 10. El anticuerpo, o fragmento del mismo, de la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo inhibe la unión entre Stx2 y un anticuerpo 11E10, en el que dicho anticuerpo 11E10 tiene una Kd de 0,50 nM o más baja, o en el que dicho anticuerpo bloquea la actividad enzimática de Stx2 o altera la distribución intracelular de Stx2.
- 40 11. Una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10.
12. Un método *in vitro* de detección de Stx2 en una muestra biológica, en el que dicha muestra biológica es de un tejido, célula, extracto de células, fluido corporal o una biopsia, comprendiendo dicho método las etapas de:
  - 45 - poner en contacto dicha muestra biológica con el anticuerpo, o fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en condiciones que permitan la formación de complejos entre dicho anticuerpo y Stx2; y
  - detectar dicho complejo.
13. Un método *in vitro* de diagnóstico de una enfermedad asociada a toxina Shiga en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

- poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en condiciones que permitan la formación de complejos entre dicho anticuerpo y Stx2; y

- detectar dicho complejo;

en el que la presencia de Stx2 en dicha muestra diagnostica al sujeto con una enfermedad asociada a toxina Shiga.

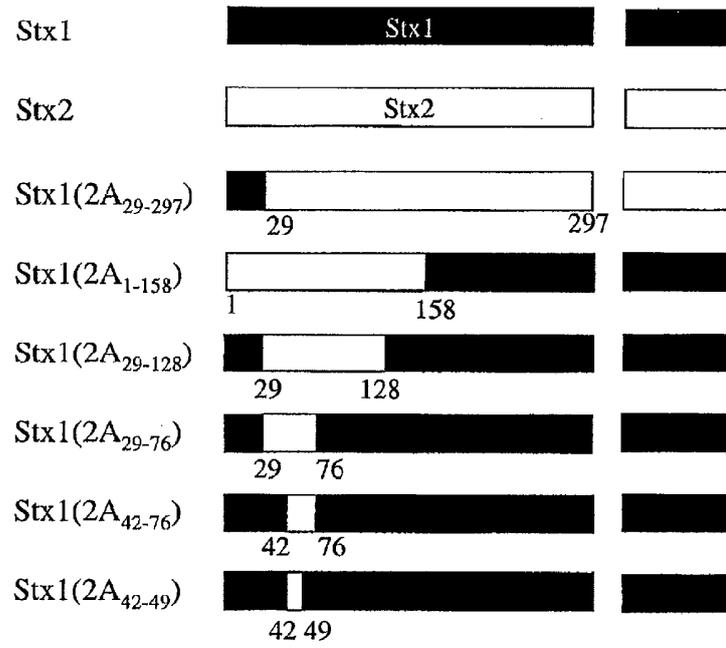
5 14. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, para su uso como un medicamento.

15. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a toxina Shiga en un sujeto.

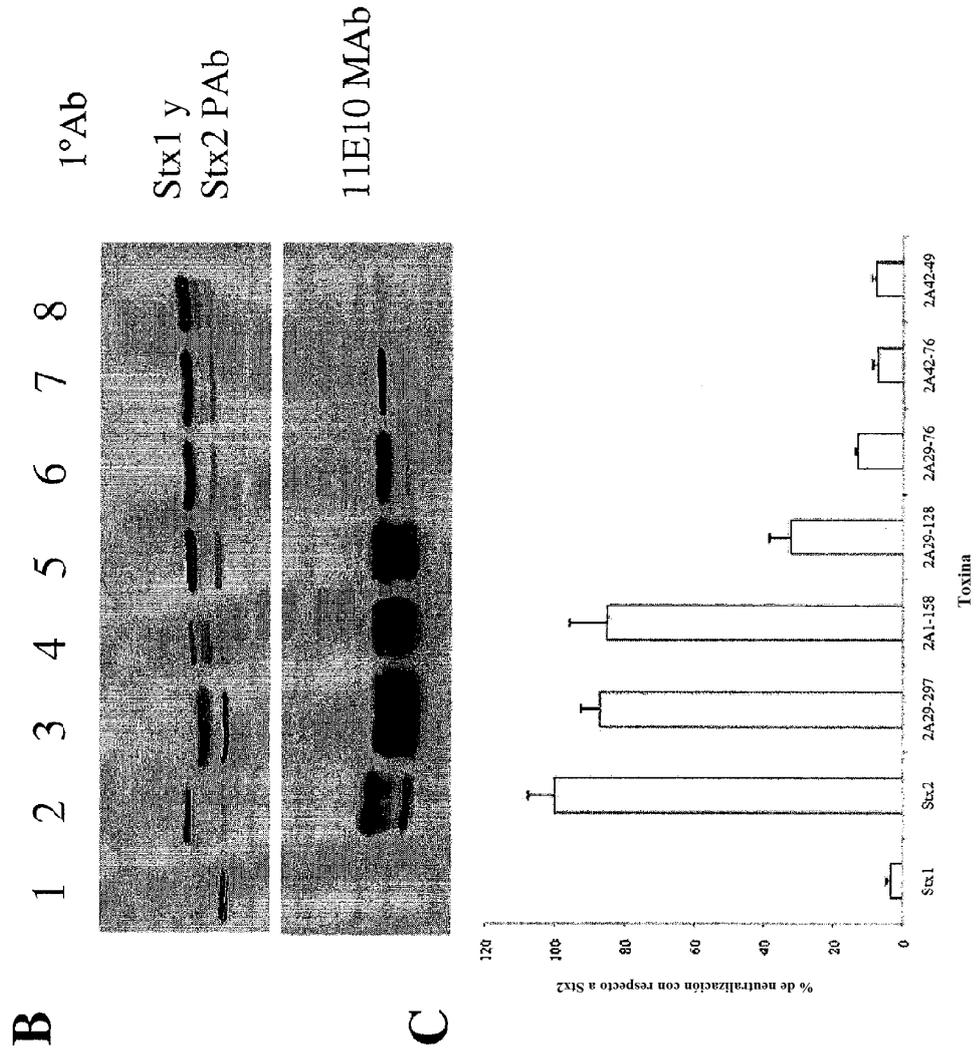
10 16. El polipéptido o anticuerpo según el uso en la reivindicación 15, en el que dicha enfermedad asociada a toxina Shiga es síndrome urémico hemolítico o una enfermedad asociada a *E. coli* o infección por *S. dysenteriae*.

**Figura 1**

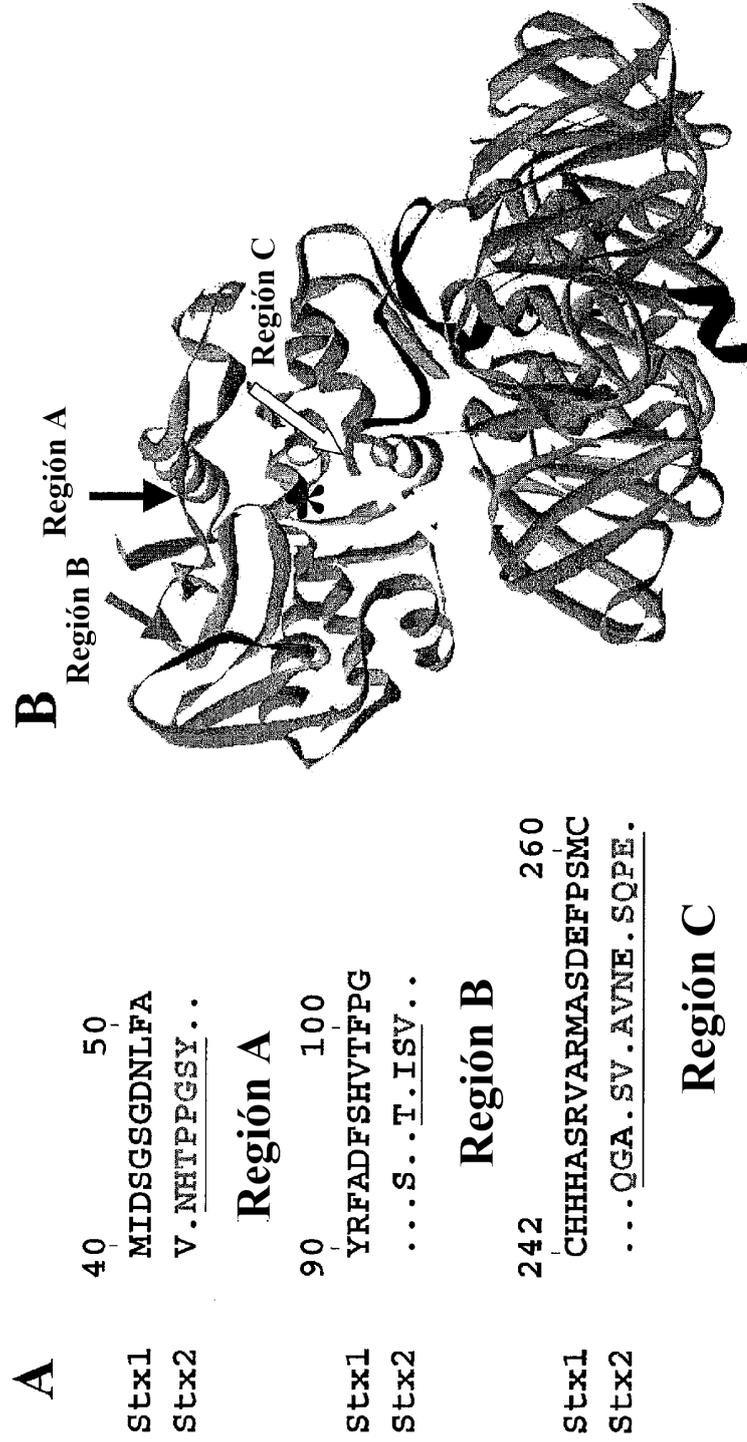
**A**



**Figura 1**

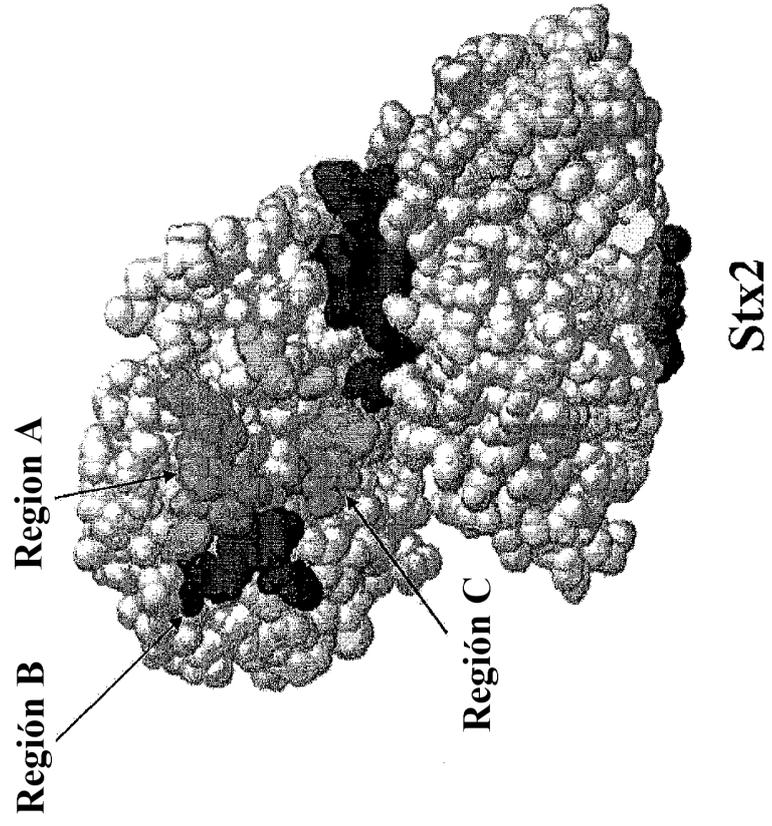


**Figura 2**



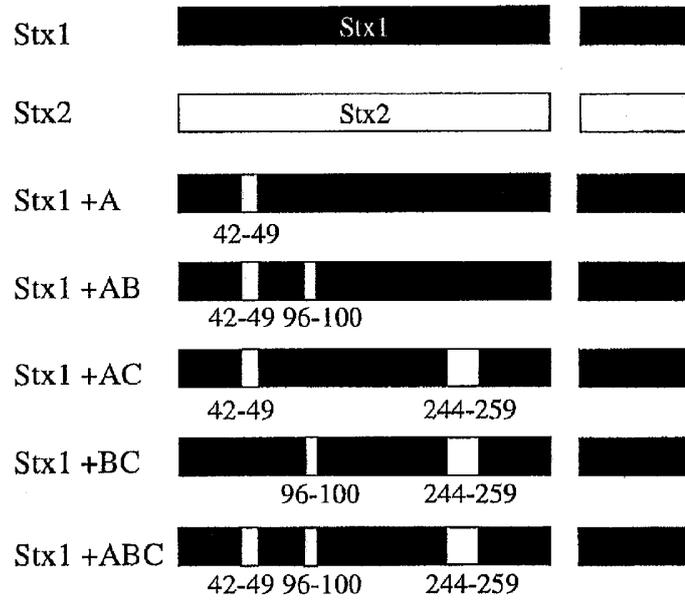
**Figura 2**

**C**

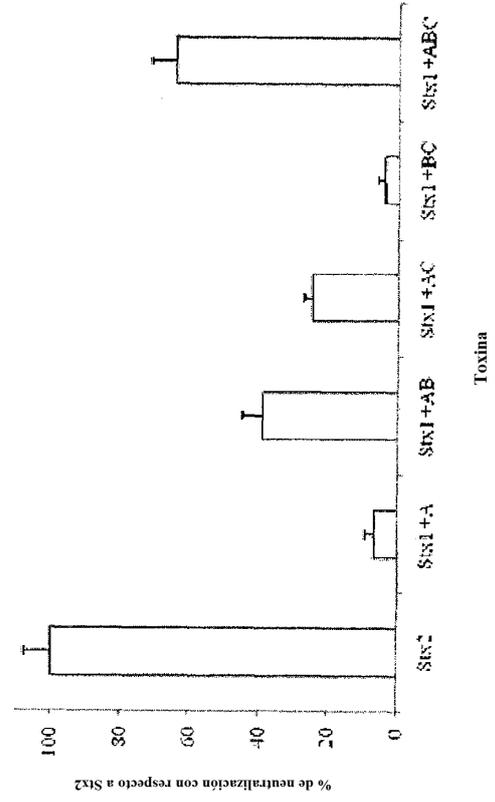
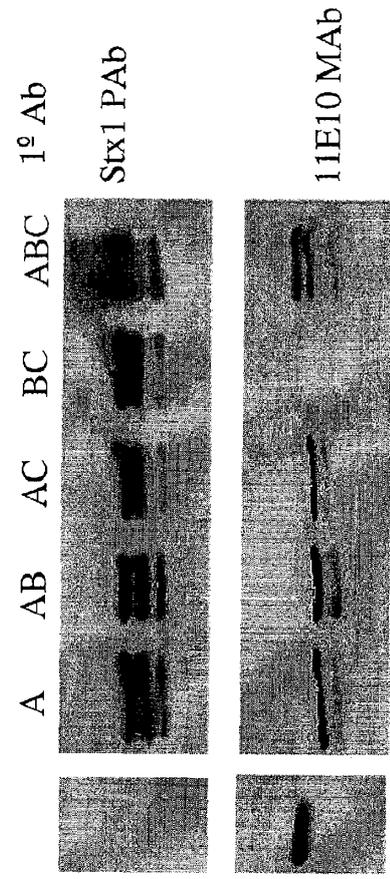


**Figura 3**

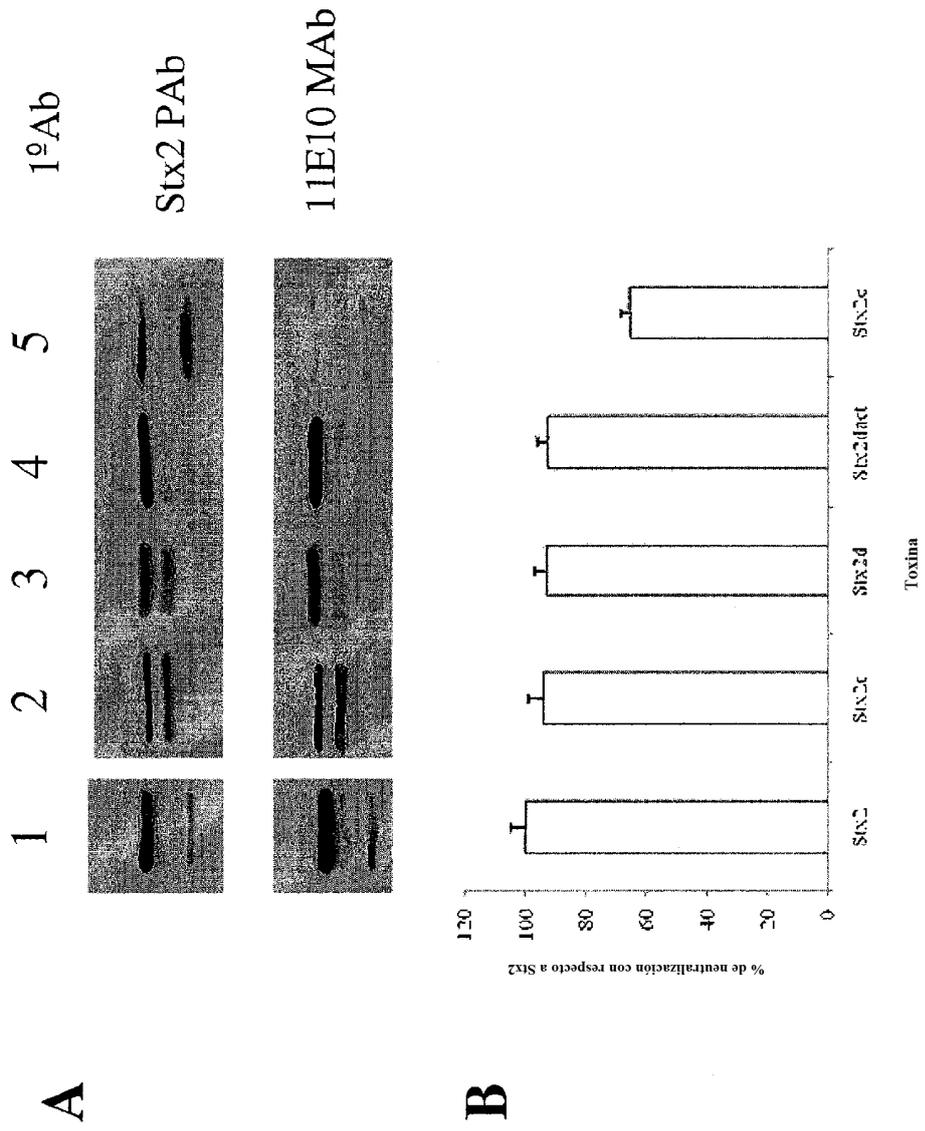
**A**



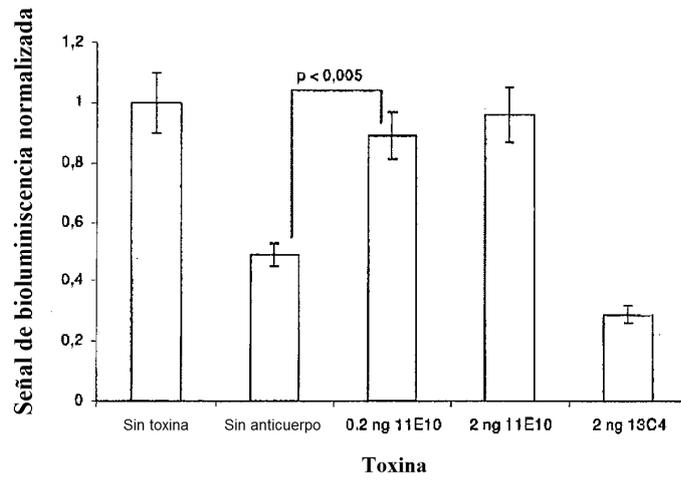
**Figura 3**



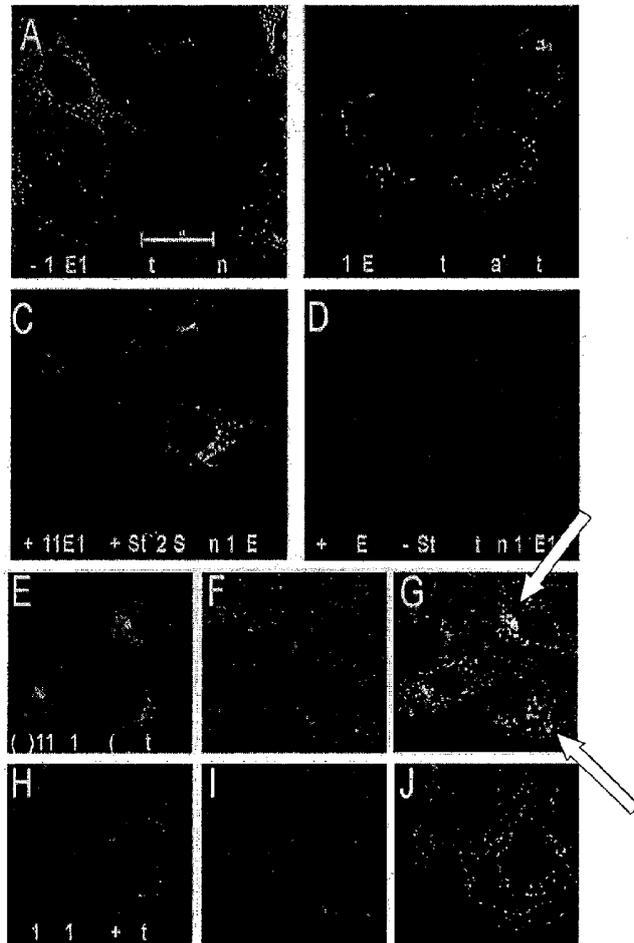
**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**



## Figura 7

- A.**      **SEQ ID NO: 1**  
NHTPPGSY
- B.**      **SEQ ID NO: 2**  
THISV
- C.**      **SEQ ID NO: 3**  
QGARSVRAVNEESQPE
- D.**      **SEQ ID NO: 19**  
AHISL

## Figura 8

- A. SEQ ID NO: 4**
- |                   |                   |                   |            |            |     |
|-------------------|-------------------|-------------------|------------|------------|-----|
| <u>MKIIIFRVLT</u> | <u>FFFVIFSVNV</u> | <u>VAKEFTLDFS</u> | TAKTYVDSLN | VIRSAIGTPL | 50  |
| QTISSGGTSL        | <u>LMINHTPPGS</u> | <u>YFAVDVRGID</u> | PEEGRFNNLR | LIVERNNLYV | 100 |
| TGFVNRTNNV        | FYRFADFSHV        | TFPGTTAVTL        | SGDSSYTTLQ | RVAGISRTGM | 150 |
| QINRHSLTTS        | YLDLMSHSGT        | SLTQSVARAM        | LRFVTVTAEA | LRFRQIQRGF | 200 |
| RTTLDDLGR         | SYVMTAEDVD        | LTLNWGRLSS        | VLPDYHGQDS | VRVGRISFGS | 250 |
| INAILGSVAL        | ILNCHHHASR        | VARMASDEFP        | SMCPADGRVR | GITHNKILWD | 300 |
| SSTLGAILMR        | RTISS             |                   |            |            | 315 |
- B. SEQ ID NO: 5**
- |                   |                    |                   |            |            |     |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------|------------|-----|
| <u>MKIIIFRVLT</u> | <u>FFFVIFSVNV</u>  | <u>VAKEFTLDFS</u> | TAKTYVDSLN | VIRSAIGTPL | 50  |
| QTISSGGTSL        | <u>LMINHTPPGS</u>  | <u>YFAVDVRGID</u> | PEEGRFNNLR | LIVERNNLYV | 100 |
| TGFVNRTNNV        | FYRFADP <u>THI</u> | <u>SVPGTTAVTL</u> | SGDSSYTTLQ | RVAGISRTGM | 150 |
| QINRHSLTTS        | YLDLMSHSGT         | SLTQSVARAM        | LRFVTVTAEA | LRFRQIQRGF | 200 |
| RTTLDDLGR         | SYVMTAEDVD         | LTLNWGRLSS        | VLPDYHGQDS | VRVGRISFGS | 250 |
| INAILGSVAL        | ILNCHHHASR         | VARMASDEFP        | SMCPADGRVR | GITHNKILWD | 300 |
| SSTLGAILMR        | RTISS              |                   |            |            | 315 |
- C. SEQ ID NO: 6**
- |                   |                    |                   |            |            |     |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------|------------|-----|
| <u>MKIIIFRVLT</u> | <u>FFFVIFSVNV</u>  | <u>VAKEFTLDFS</u> | TAKTYVDSLN | VIRSAIGTPL | 50  |
| QTISSGGTSL        | <u>LMINHTPPGS</u>  | <u>YFAVDVRGID</u> | PEEGRFNNLR | LIVERNNLYV | 100 |
| TGFVNRTNNV        | FYRFADFSHV         | TFPGTTAVTL        | SGDSSYTTLQ | RVAGISRTGM | 150 |
| QINRHSLTTS        | YLDLMSHSGT         | SLTQSVARAM        | LRFVTVTAEA | LRFRQIQRGF | 200 |
| RTTLDDLGR         | SYVMTAEDVD         | LTLNWGRLSS        | VLPDYHGQDS | VRVGRISFGS | 250 |
| INAILGSVAL        | ILNCH <u>HQGAR</u> | <u>SVRAVNEESQ</u> | PECPADGRVR | GITHNKILWD | 300 |
| SSTLGAILMR        | RTISS              |                   |            |            | 315 |
- D. SEQ ID NO: 7**
- |                   |                    |                   |            |            |     |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------|------------|-----|
| <u>MKIIIFRVLT</u> | <u>FFFVIFSVNV</u>  | <u>VAKEFTLDFS</u> | TAKTYVDSLN | VIRSAIGTPL | 50  |
| QTISSGGTSL        | <u>LMIDSGSGDN</u>  | <u>LFAVDVRGID</u> | PEEGRFNNLR | LIVERNNLYV | 100 |
| TGFVNRTNNV        | FYRFADP <u>THI</u> | <u>SVPGTTAVTL</u> | SGDSSYTTLQ | RVAGISRTGM | 150 |
| QINRHSLTTS        | YLDLMSHSGT         | SLTQSVARAM        | LRFVTVTAEA | LRFRQIQRGF | 200 |
| RTTLDDLGR         | SYVMTAEDVD         | LTLNWGRLSS        | VLPDYHGQDS | VRVGRISFGS | 250 |
| INAILGSVAL        | ILNCH <u>HQGAR</u> | <u>SVRAVNEESQ</u> | PECPADGRVR | GITHNKILWD | 300 |
| SSTLGAILMR        | RTISS              |                   |            |            |     |
- E. SEQ ID NO: 8**
- |                   |                    |                   |            |            |     |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------|------------|-----|
| <u>MKIIIFRVLT</u> | <u>FFFVIFSVNV</u>  | <u>VAKEFTLDFS</u> | TAKTYVDSLN | VIRSAIGTPL | 50  |
| QTISSGGTSL        | <u>LMINHTPPGS</u>  | <u>YFAVDVRGID</u> | PEEGRFNNLR | LIVERNNLYV | 100 |
| TGFVNRTNNV        | FYRFADP <u>THI</u> | <u>SVPGTTAVTL</u> | SGDSSYTTLQ | RVAGISRTGM | 150 |
| QINRHSLTTS        | YLDLMSHSGT         | SLTQSVARAM        | LRFVTVTAEA | LRFRQIQRGF | 200 |
| RTTLDDLGR         | SYVMTAEDVD         | LTLNWGRLSS        | VLPDYHGQDS | VRVGRISFGS | 250 |
| INAILGSVAL        | ILNCH <u>HQGAR</u> | <u>SVRAVNEESQ</u> | PECPADGRVR | GITHNKILWD | 300 |
| SSTLGAILMR        | RTISS              |                   |            |            | 315 |

**Figura 9****A. SEQ ID NO: 9**

```

1 ATGAAAATAA TTATTTTATAG AGTGCTAACT TTTTCTTTG TTATCTTTTC AGTTAATGTG
61 GTGGCGAAGG AATTTACCTT AGACTTCTCG ACTGCAAAGA CGTATGTAGA TTCGCTGAAT
121 GTCATTCGCT CTGCAATAGG TACTCCATTA CAGACTATTT CATCAGGAGG TACGTCTTTA
181 CTGATGATG ATAGTGGCTC AGGGGATAAT TTGTTTGCAG TTGATGTCAG AGGGATAGAT
241 CCAGAGGAAG GCGGTTTTAA TAATCTACGG CTTATTGTTG AACGAAATAA TTTATATGTG
301 ACAGGATTTG TTAACAGGAC AAATAATGTT TTTTATCGCT TTGCTGATTT TTCACATGTT
361 ACCTTTCCAG GTACAACAGC GGTACATTG TCTGGTGACA GTAGCTATAC CACGTTACAG
421 CGTGTTCAG GATCAGTCG TACGGGGATG CAGATAAATC GCCATTCGTT GACTACTTCT
481 TATCTGGATT TAATGTCGCA TAGTGGAAAC TCACTGACGC AGTCTGTGGC AAGAGCCGATG
541 TTACGGTTTG TTAGTGTGAC AGCTGAAGCT TTACGTTTTC GGCAAATACA GAGGGGATTT
601 CGTACAACAC TGGATGATCT CAGTGGGCGT TCTTATGTAA TGACTGCTGA AGATGTTGAT
661 CTTACATTGA ACTGGGGAAG GTTGAGTAGC GTCCCTGCCTG ACTATCATGG ACAAGACTCT
721 GTTCGTGTAG GAAGAATTC TTTTGAAGC ATTAATGCAA TTCTGGGAAG CGTGGCATT
781 ATACTGAATT GTCATCATCA TGCATCCGCA GTTCCAGAA TGGCATCTGA TGAGTTTCCT
841 TCTATGTGTC CGGCAGATGG AAGAGTCCGT GGGATTACCG ACAATAAAAT ATTGTGGGAT
901 TCATCCACTC TGGGGGCAAT TCTGATGCCG AGAACTATTA GCAGTTGAGG GGGTAAATG
961 AAAAAACAT TATTAATAGC TGCATCCGCT TCATTTTTC CAGCAAGTGC GCTGGGCGAC
1021 CCTGATGTG TAACTGGAAA GGTGGAGTAT ACAAATATA ATGATGACGA TACGTTTACA
1081 GTTAAAGTGG GTGATAAAGA ATTATTTACC AACAGATGGA ATCTTCAGTC ICTTCTTCTC
1141 AGTGGCGAAA TTACGGGGAT GACTGTAACC ATTAATAACTA ATGCTGTGCA TAATGGAGGG
1201 GGATTCAGCG AAGTTATTTT TCGTTGA

```

**B. SEQ ID NO: 10**

```

1 ATGAAAATAA TTATTTTATAG AGTGCTAACT TTTTCTTTG TTATCTTTTC AGTTAATGTG
61 GTGGCGAAGG AATTTACCTT AGACTTCTCG ACTGCAAAGA CGTATGTAGA TTCGCTGAAT
121 GTCATTCGCT CTGCAATAGG TACTCCATTA CAGACTATTT CATCAGGAGG TACGTCTTTA
181 CTGATGATG ATAGTGGCTC AGGGGATAAT TTGTTTGCAG TTGATGTCAG AGGGATAGAT
241 CCAGAGGAAG GCGGTTTTAA TAATCTACGG CTTATTGTTG AACGAAATAA TTTATATGTG
301 ACAGGATTTG TTAACAGGAC AAATAATGTT TTTTATCGCT TTGCTGATTT TTCACATGTT
361 ACCTTTCCAG GTACAACAGC GGTACATTG TCTGGTGACA GTAGCTATAC CACGTTACAG
421 CGTGTTCAG GATCAGTCG TACGGGGATG CAGATAAATC GCCATTCGTT GACTACTTCT
481 TATCTGGATT TAATGTCGCA TAGTGGAAAC TCACTGACGC AGTCTGTGGC AAGAGCCGATG
541 TTACGGTTTG TTAGTGTGAC AGCTGAAGCT TTACGTTTTC GGCAAATACA GAGGGGATTT
601 CGTACAACAC TGGATGATCT CAGTGGGCGT TCTTATGTAA TGACTGCTGA AGATGTTGAT
661 CTTACATTGA ACTGGGGAAG GTTGAGTAGC GTCCCTGCCTG ACTATCATGG ACAAGACTCT
721 GTTCGTGTAG GAAGAATTC TTTTGAAGC ATTAATGCAA TTCTGGGAAG CGTGGCATT
781 ATACTGAATT GTCATCATCA TGCATCCGCA GTTCCAGAA TGGCATCTGA TGAGTTTCCT
841 TCTATGTGTC CGGCAGATGG AAGAGTCCGT GGGATTACCG ACAATAAAAT ATTGTGGGAT
901 TCATCCACTC TGGGGGCAAT TCTGATGCCG AGAACTATTA GCAGTTGA

```

**C. SEQ ID NO: 11**

```

1 ATGAAAAAAA CATTATTAAT AGCTGCATCG CTTTCATTTT TTTTACGCAAG TCGGCTGGCC
61 ACGCCTGATT GTGTAACCTG AAAGGTGGAG TATACAAAAT ATAATGATGA CGATACCTTT
121 ACAGTTAAAG TGGCTCATAA AGAATTATTT ACCAACAGAT GGAATCTTCA GTCCTTCTT
181 CTCAGTCCGC AAATTACGGG GATGACTGTA ACCATTAAAA CTAATGCCCTG TCATAATGGA
241 CCGGGATTCA GCGAAGTTAT TTTTCTTTGA

```

## Figura 10

### A. SEQ ID NO: 12

1 MKIIIFRVL FFVIFSVNV VAKEFTLDES TAKTYVDSL VIRSAIGTPL QTISSGGTSL  
61 LMIDSGSDN LEAVDVRGID PEEGRFNLR LIVERNNLYV TGFVNRNNTNV FYRFADFSHV  
121 TFFPGTTAVL SGDSSYTLQ RVAGISRGM QINRHSLTTS YLDLMSHSGT SLTQSVARAM  
181 LRFVTVTAEA LRFRQIQRF RTTLDLDSGR SYVMTAEDVD LTLNWGRSS VLPDYHGQDS  
241 VRVGRISFGS INAILGSVAL ILNCHHHR VARMASDEFF SMCPADGRVR GITHNKILWD  
301 SSTLGAILMR RTISS

### B. SEQ ID NO: 13

1 MKKTLLIAAS LSFFSASALA TPDCVTGKVE YTKYNDDTF TVKVGDKELF TNRWNLQSL  
61 LSAQITGMTV TIKTNACHNG GGFSEVIFR

**Figura 11**

**A. SEQ ID NO: 14**

```

1 ATGAAGTGTA TATTATTAA ATGGGTACTG TGCCTGTTAC TGGGTTTTTC TTCGGTATCC
61 TATTCCCGGG AGTTTACGAT AGACTTTTCG ACCCAACAAA GTTATGTCTC TTCGTTAAAT
121 ACTATACCGA CAGAGATATC GACCCCTCTT GAACATATAT CTCAGGGGAC CACATCGGTG
181 TCTGTTATTA ACCACACCCC ACCGGGCAGT TATTTTGCTG TGGATATACG AGGGCTTGAT
241 GTCTATCAGG CGCGTTTTGA CCATCTTCGT CTGATTATTG AGCAAAATAA TTTATATGTG
301 GCCGGGTTCC TTAATACGGC AACAAATACT TTCTACCGTT TTTCAGATTT TACACATATA
361 TCAGTGCCCG GTGTGACAAC GGTTCATG ACAACGGACA GCAGTTATAC CACTCTGCAA
421 CGTGTCCGAG CGCTGGAACG TTCCGGAATG CAAATCAGTC GTCACTCACT GGTTCATCA
481 TATCTGGCGT TAATGGAGTT CAGTGGTAAT ACAATGACCA GAGATGCATC CAGAGCAGTT
541 CTGCGTTTTG TCACTGTCAC AGCAGAAGCC TTACGCTTCA GGCAGATACA GAGAGAATTT
601 CGTCAGGCAC TGCTGAAAC TGCTCCTGTG TATACGATGA CGCCGGGAGA CGTGGACCTC
661 ACTCTGAACT GGGGGCGAAT CAGCAATGTG CTTCGGGAGT ATCGGGGAGA GGATGGTGTG
721 AGAGTGGGGA GAATATCCTT TAATAATATA TCAGCGATAC TGGGGACTGT GGCCGTATA
781 CTGAATTGCC ATCATCAGGG GCGCGTCTT GTTCGCGCCG TGAATGAAGA GAGTCAACCA
841 GAATGTCAGA TAACTGGCGA CAGGCCTGTT ATAAAAATAA ACAATACATT ATGGGAAAGT
901 AATACAGCTG CAGCGTTTCT GAACAGAAAG TCACAGTTTT TATATACAAC GGGTAATAAA
961 AGGAGTTAAG CATGAAGAAG ATGTTTATGG CGGTTTTATT TGCATTAGCT TCTGTTAATG
1021 CAATGGCGGC GGATTTGTCCT AAAGCTAAAA TTGAGTTTTC CAAGTATAAT GAGGATGACA
1081 CATTTACAGT GAAGGTTGAC GGGAAAGAA ACTGGACCAG TCGCTGGAA CTGCAACCGT
1141 TACTGCAAAG TGCTCAGTTG ACAGCAATGA CTGTCACAAT CAAATCCAGT ACCTGTGAAT
1201 CAGGCTCCGG ATTTGCTGAA GTGCAGTTTA ATAATGACTG A
    
```

**B. SEQ ID NO: 15**

```

1 ATGAAGTGTA TATTATTAA ATGGGTACTG TGCCTGTTAC TGGGTTTTTC TTCGGTATCC
61 TATTCCCGGG AGTTTACGAT AGACTTTTCG ACCCAACAAA GTTATGTCTC TTCGTTAAAT
121 AGTATACCGA CAGAGATATC GACCCCTCTT GAACATATAT CTCAGGGGAC CACATCGGTG
181 TCTGTTATTA ACCACACCCC ACCGGGCAGT TATTTTGCTG TGGATATACG AGGGCTTGAT
241 GTCTATCAGG CGCGTTTTGA CCATCTTCGT CTGATTATTG AGCAAAATAA TTTATATGTG
301 GCCGGGTTCC TTAATACGGC AACAAATACT TTCTACCGTT TTTCAGATTT TACACATATA
361 TCAGTGCCCG GTGTGACAAC GGTTCATG ACAACGGACA GCAGTTATAC CACTCTGCAA
421 CGTGTCCGAG CGCTGGAACG TTCCGGAATG CAAATCAGTC GTCACTCACT GGTTCATCA
481 TATCTGGCGT TAATGGAGTT CAGTGGTAAT ACAATGACCA GAGATGCATC CAGAGCAGTT
541 CTGCGTTTTG TCACTGTCAC AGCAGAAGCC TTACGCTTCA GGCAGATACA GAGAGAATTT
601 CGTCAGGCAC TGCTGAAAC TGCTCCTGTG TATACGATGA CGCCGGGAGA CGTGGACCTC
661 ACTCTGAACT GGGGGCGAAT CAGCAATGTG CTTCGGGAGT ATCGGGGAGA GGATGGTGTG
721 AGAGTGGGGA GAATATCCTT TAATAATATA TCAGCGATAC TGGGGACTGT GGCCGTATA
781 CTGAATTGCC ATCATCAGGG GCGCGTCTT GTTCGCGCCG TGAATGAAGA GAGTCAACCA
841 GAATGTCAGA TAACTGGCGA CAGGCCTGTT ATAAAAATAA ACAATACATT ATGGGAAAGT
901 AATACAGCTG CAGCGTTTCT GAACAGAAAG TCACAGTTTT TATATACAAC GGGTAATAAA
    
```

**C. SEQ ID NO: 16**

```

1 ATGAAGAAGA TGTTTATGGC GGTTTTATT GCATTAGCTT CTGTTAATGC AATGGCGGCG
61 GATTGTGCTA AAGGTAAAA TGAGTTTCC AAGTATAATG AGGATGACAC ATTTACAGTG
121 AAGGTTGACG GGAAGAATA CTGGACCACT CGCTGGAAAT TGCACCAATC CCTGTGAATC
181 GCTCAGTTGA CAGGAATGAC TGTCACAATC AAATCCAGTA CCTGTGAATC AGGCTCCGGA
241 TTTGCTGAAG TGCAGTTTAA TAATGACTGA
    
```

## Figura 12

### A. SEQ ID NO: 17

```

1  MKCILFKWVL  CLLLGFSSVS  YSREFTIDFS  TQOSYVSSLN  SIRTEISTPL  EHSIQGTTSV
61  SVINHTPPGS  YFAVDIRGLD  VYQARFDHLR  LIIEQNPLYV  AGFVNTATNT  FYRFSDFTHI
121  SVPGVTTVSM  TTDSSYTLLQ  RVAALERSGM  QISRHSLVSS  YLALMEFSGN  TMTRDASRAV
181  LRFVTVTAEA  LRFRIQREF  RQALSETAPV  YTMFPGDVDL  TLNWGRISNV  LPEYRGEDEV
241  RVGRISFNFI  SAILGTVAVI  LNCHHQGARS  VRAVNEESQP  ECQITGDRPV  IKINNTLWES
301  NTAAAFLENK  SQFLYTTGK
    
```

### B. SEQ ID NO: 18

```

1  MKKMFMAVLF  ALASVNAMAA  DCAKGKIEFS  KYNEDDTFTV  KVDGKEYWTS  RWNLQPLLQS
61  AQLTGMTVII  KSSTCESGSG  FAEVQFNND
    
```