

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 912**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/106** (2006.01)

**A61K 39/108** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2010 PCT/SE2010/050996**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011 WO2011034495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2010 E 10817520 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2477649**

54 Título: **Vacuna contra la diarrea debida a E. coli enterotoxigénica (ETEC) y el cólera**

30 Prioridad:

**16.09.2009 US 272351 P**

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

**14.06.2017**

73 Titular/es:

**MSD WELLCOME TRUST HILLEMANN  
LABORATORIES PVT LTD. (100.0%)  
2nd Floor, Nanotechnology Building Jamia  
Hamdard Hamdard Nagar  
New Delhi 110062, IN**

72 Inventor/es:

**HOLMGREN, JAN y  
LEBENS, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 616 912 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

Vacuna contra la diarrea debida a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y el cólera

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere al campo de vacunas, en particular a vacunas contra la diarrea debida a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y el cólera.

10 **Antecedentes de la invención**

El cólera sigue siendo un problema sanitario principal en grandes partes del mundo. Esto también es cierto para ETEC, que es la principal causa de enfermedad diarreica en países en desarrollo así como en las personas que viajan a estos países. En muchos países en desarrollo, las medidas sanitarias y de agua eficaces para el control del cólera y otras infecciones entéricas son actualmente imposibles, y en este contexto, las vacunas desempeñan un papel importante. Sin embargo, para poder hacerlo, tienen que ser eficaces, de fácil acceso y, por encima de todo, económicas. También existe la necesidad médica y un mercado comercial sustancial para el uso de vacunas frente al cólera y, especialmente, ETEC en viajeros.

20 Un enfoque ha sido el desarrollo de vacunas de células completas inactivadas orales. Dukoral™ es una vacuna de células oral (OCV) con una eficacia demostrada de hasta el 90% contra el cólera y también una eficacia significativa contra diarrea inducida por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). Comprende 3 cepas diferentes de *V. cholerae* en cuatro formulaciones diferentes (dos inactivadas por calor y dos inactivadas con formalina) y además, subunidad de toxina colérica B producida de manera recombinante (rCTB). El componente de rCTB contribuye significativamente a la eficacia contra el cólera y es exclusivamente responsable de la protección observada contra la diarrea debida a ETEC debido a su capacidad para inducir anticuerpos de neutralización cruzada contra la toxina termolábil (LT) de *E. coli* similar a la toxina colérica (CT). Sin embargo, rCTB es lábil a los ácidos y, por tanto, la vacuna (que tiene que proporcionarse en dos dosis) debe administrarse con un tampón bicarbonato.

30 A pesar de que Dukoral™ es la única OCV autorizada internacionalmente, actualmente están comercializándose copias de esta vacuna con o sin el componente de CTB en países en desarrollo: Vietnam, India y China. La OCV producida en Vietnam e India (que carece del componente de CTB) contiene los mismos 4 componentes bacterianos que Dukoral más una quinta cepa de *V. cholerae* inactivada con formalina del serogrupo O139.

35 La inmunidad protectora contra el cólera provocada por las OCV se basa principalmente, si no exclusivamente, en la producción por la mucosa de anticuerpos contra lipopolisacárido O1 de la pared celular (LPS O1) y para la vacuna Dukoral que contiene CTB, también anticuerpos antitoxina en el intestino.

40 A partir de lo anterior es evidente que el presente estado de la técnica para la producción de vacuna contra el cólera/ETEC dista mucho de ser sencillo y, aunque ya es eficaz, una contribución real para hacer que una vacuna contra el cólera fuese más accesible sería racionalizar la composición de la formulación a varios niveles.

45 La necesidad de incluir varias cepas diferentes de *Vibrio cholerae* en vacunas de células completas inactivadas tales como Dukoral™ surge de la necesidad de representar varias variantes antigénicas diferentes de *Vibrio cholerae* en la vacuna. Todas las cepas protectoras en las vacunas que se usan actualmente son del serogrupo O1, que hasta 1993 era el único de más de 200 serogrupos identificados conocidos que provocan cólera epidémico y es todavía el serogrupo dominante. Sin embargo, el serogrupo O1 tiene dos variantes denominadas serotipos Ogawa e Inaba que difieren en la metilación del azúcar terminal del antígeno O del lipopolisacárido de superficie (LPS). Se sabe que se produce cambio de serotipo, en el que el organismo de serotipo Ogawa puede dar lugar a organismos Inaba. Sin embargo, el cambio inverso es poco común.

50 Aunque la inmunización con especialmente el serotipo Inaba pero también Ogawa, puede dar lugar a anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con los otros serotipos, también da lugar a anticuerpos específicos de serotipo que contribuyen significativamente a la protección. Por tanto, una vacuna eficaz debe inducir no sólo anticuerpos de reacción cruzada, sino también anticuerpos específicos de serotipo contra las variantes de serotipo tanto Inaba como Ogawa.

55 Se sabe que el cambio de serotipo está relacionado con una mutación en un único gen (*wbeT*). Cualquier mutación que inactive este gen da como resultado un cambio del serotipo Ogawa al Inaba. Las mutaciones que pueden revertir un acontecimiento de este tipo son previsiblemente mucho más infrecuentes, aunque un cambio del serotipo Inaba al Ogawa puede lograrse fácilmente mediante la provisión del gen relevante *in trans*. El gen implicado (*wbeT*, también denominado *rfbT*) codifica para una metil transferasa que metila el residuo de perosamina terminal en la unidad de repetición del polisacárido del antígeno O. Las mutaciones en este gen que conducen al serotipo Inaba son casi invariablemente inserciones, deleciones o cambios de base que introducen un codón sin sentido.

60 También se ha documentado que se produce en la naturaleza una tercera variante O1 conocida como Hikojima.

Hikojima se caracteriza porque expresa los determinantes tanto Ogawa como Inaba sobre su superficie y se aglutina con antisueros específicos para ambos tipos. El fenotipo Hikojima es extremadamente poco común y en la bibliografía se considera que es una forma de transición inestable.

5 Chiang y Mekalonos (Infection and Immunity, vol. 68, n.º 11, 1 de enero de 2000 (01-01-2000), páginas 6391-6397, XP008153886, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/1A1.68.11) notifican la construcción de un candidato a vacuna contra *Vibrio cholerae* usando administración de transposones y excisión mediada por recombinasa FLP. Un candidato a vacuna Inaba+ móvil, Peru-2, se convirtió en Ogawa+ no móvil mediante manipulación.

10 Rijpkema *et al.* (Journal of Medical Microbiology, vol. 53, n.º 11, 1 de noviembre de 2004 (01-11-2004), páginas 1105-1107, XP055048436, ISSN: 0022-2615, DOI: 10.1099/jmm.0.45744-0) notifican el análisis de mutaciones de *WbeT* en aislados clínicos de *Vibrio cholerae*.

15 Kanungo *et al.* (Vaccine, vol. 27, n.º 49, 16 de noviembre de 2009 (16-11-2009), páginas 6887-6893, XP026722082, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.Vaccine.2009.09.008) notifican un ensayo aleatorizado controlado por placebo de una vacuna contra el cólera, oral, de células completas, inactivadas, bivalente, reformulada, realizado entre adultos y niños en Calcuta, India.

20 Sanchez y Holmgren (Current Opinion in Immunology, vol. 17, n.º 4, 1 de agosto de 2005 (01-08-2005), páginas 388-398, XP027787152, ISSN: 0952-7915) revisan factores de virulencia, patogénesis y protección de la vacuna en diarrea debida a ETEC y cólera.

Con esto en mente, los inventores han propuesto diseñar mediante ingeniería genética una única cepa de vacuna de *V. cholerae* que reemplazaría eficazmente a las tres cepas usadas actualmente.

25 Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar una vacuna eficaz contra la diarrea debida a ETEC y/o el cólera, con una formulación simplificada y con menores costes de producción y que también produce idealmente inmunidad protectora tras una única administración.

### 30 Sumario de la invención

La presente invención describe la construcción, el método de producción, la formulación y el uso preventivo médico de una vacuna novedosa contra el cólera y/o ETEC. No todos los aspectos dados a conocer en el presente documento son parte de la invención que se reivindica en el presente documento. El tema reivindicado se limita a lo especificado en las reivindicaciones adjuntas.

A lo largo de este texto, en línea con la práctica científica establecida, la designación "*wbeT*" (en cursiva) indica el gen, mientras que la designación "*WbeT*" (en cursiva) indica una proteína codificada por un gen *wbeT*.

40 En un primer aspecto, se proporciona una vacuna que comprende una célula de *Vibrio cholerae* O1, caracterizada porque dicha célula comprende antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba, en la que la vacuna comprende múltiples células de *Vibrio cholerae* O1 que comprenden antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba, y en la que, en promedio, el 10-90% de los antígenos O1 de dichas células son del serotipo Ogawa.

45 Más preferiblemente, el 10-70% del antígeno O1 expresado por las células es del serotipo Ogawa. Aún más preferiblemente, el 10-50% del antígeno O1 expresado por las células es del serotipo Ogawa. Todavía más preferiblemente, el 10-40% del antígeno O1 expresado por las células es del serotipo Ogawa. Lo más preferiblemente, el 10-30% del antígeno O1 expresado por las células es del serotipo Ogawa.

50 La célula de la vacuna puede comprender además una o más proteínas de factor de colonización (CF) de ETEC, tales como CFA/I, CS2 o CS5, en la que dicha(s) proteína(s) de CF se expresa(n) o bien como fimbrias únicas, dobles o bien híbridas.

55 Preferiblemente, dicha vacuna no contiene ninguna célula completa inmunológicamente activa adicional además de células de *Vibrio cholerae* O1 que comprenden antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba.

Preferiblemente, la vacuna es para administración oral. Preferiblemente, la célula en la vacuna está inactivada con formalina.

60 Preferiblemente, la célula es una célula genéticamente modificada, preferiblemente una célula genéticamente modificada según el séptimo u octavo aspecto de la invención (véase a continuación).

65 En un segundo aspecto, se proporciona una vacuna según el primer aspecto, para su uso en inmunización preventiva, preferiblemente para su uso en inmunización preventiva contra el cólera y/o infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

En un tercer aspecto (no parte de la invención reivindicada), se describe un método para inducir inmunidad preventiva, que comprende administrar una vacuna según el primer aspecto a un sujeto que va a inmunizarse. Preferiblemente, la inmunidad preventiva es contra el cólera y/o infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). También preferiblemente, la administración se realiza por vía oral.

5 En un cuarto aspecto (no parte de la invención reivindicada como tal), se da a conocer un constructo de ADN, que comprende ADN que codifica para una proteína *WbeT* que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 (más preferiblemente al menos el 80% de identidad, incluso más preferiblemente al menos el 90% de identidad, aún más preferiblemente al menos el 95% de identidad y lo más preferiblemente al menos el 99% de identidad) acoplado operativamente a un promotor adecuado para inducir expresión de proteínas en una célula huésped de *Vibrio cholerae* O1, caracterizado porque la proteína *WbeT* codificada comprende modificaciones de secuencia en relación con SEQ ID NO: 6 que reducen la actividad enzimática de la proteína codificada en relación con la actividad enzimática de una proteína con una secuencia idéntica a SEQ ID NO: 6.

15 Preferiblemente, las modificaciones de secuencia comprenden una sustitución del residuo de serina en la posición 158 de SEQ ID NO: 6, más preferiblemente una sustitución del residuo de serina en la posición 158 de SEQ ID NO: 6 por glicina, prolina, treonina, fenilalanina o triptófano

20 En un quinto aspecto (no parte de la invención reivindicada como tal), se da a conocer un constructo de ADN, que comprende ADN que codifica para una proteína *WbeT* que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 (más preferiblemente al menos el 80% de identidad, incluso más preferiblemente al menos el 90% de identidad, aún más preferiblemente al menos el 95% de identidad y lo más preferiblemente al menos el 99% de identidad) acoplado operativamente a un promotor adecuado para inducir expresión de proteínas en una célula huésped de *Vibrio cholerae* O1, caracterizado porque el promotor es adecuado para inducir la expresión de la proteína *WbeT* codificada en una célula huésped de *Vibrio cholerae* O1, inicialmente de fenotipo Inaba (es decir, célula huésped que es Inaba antes de la transformación mediante el constructo de ADN) hasta un nivel de expresión de proteína *WbeT* transgénica tal que permite la expresión simultánea de antígenos tanto Inaba como Ogawa por la célula huésped.

30 Preferiblemente, el promotor de los aspectos anteriores es un promotor inducible, tal como un promotor *tac* o *lac*.

Preferiblemente, el constructo de ADN de los aspectos anteriores es un vector de plásmido que puede provocar replicación en una célula huésped o un vector que puede provocar integración cromosómica en una célula huésped.

35 Preferiblemente, el constructo de ADN según los aspectos anteriores comprende además un marcador seleccionable, más preferiblemente un marcador seleccionable positivo tal como un marcador seleccionable metabólico o gen de resistencia a antibióticos.

40 En un sexto aspecto (no parte de la invención reivindicada como tal), se describe un constructo de ADN para la recombinación homóloga en un huésped de *Vibrio cholerae* O1, caracterizado porque el constructo está adaptado para modificar el gen *wbeT* endógeno del huésped por medio de recombinación homóloga. Preferiblemente, el constructo de ADN según el sexto aspecto comprende además un marcador seleccionable, más preferiblemente un marcador seleccionable positivo tal como marcador seleccionable metabólico o gen de resistencia a antibióticos.

45 En un séptimo aspecto (no parte de la invención reivindicada como tal), se da a conocer una célula de *Vibrio cholerae* O1 que expresa simultáneamente los antígenos tanto Inaba como Ogawa, caracterizada porque

a. el gen *wbeT* endógeno de la célula huésped o la proteína codificada del mismo está inactivo/a;

50 b. la célula comprende un constructo de ADN recombinante que induce la expresión de la actividad enzimática de *WbeT*; y en el que

c. el nivel de actividad enzimática de *WbeT* transgénica es tal que la célula expresa simultáneamente antígenos Inaba y Ogawa.

55 Preferiblemente, el constructo de ADN recombinante de los aspectos anteriores es un constructo de ADN según los aspectos cuarto a quinto.

60 En un octavo aspecto, se proporciona una célula de *Vibrio cholerae* O1 que expresa simultáneamente antígenos tanto Inaba como Ogawa, caracterizada porque

a. la célula comprende un gen *wbeT* endógeno; y

65 b. la célula comprende un constructo de ADN recombinante que puede modular el nivel de expresión del gen *wbeT* endógeno o la actividad enzimática del producto del mismo; y en el que

c. el nivel modulado de actividad enzimática de *WbeT* es tal que la célula expresa simultáneamente antígenos Inaba y Ogawa, en el que el 10-90% del antígeno O1 expresado por la célula es del serotipo Ogawa.

5 Preferiblemente, el constructo de ADN recombinante del aspecto anterior es un constructo de ADN según el sexto aspecto.

10 Preferiblemente, el 10-90% del antígeno O1 expresado por la célula de los aspectos anteriores es del serotipo Ogawa. Más preferiblemente, el 10-70% del antígeno O1 expresado por la célula de los aspectos anteriores es del serotipo Ogawa. Aún más preferiblemente, el 10-50% del antígeno O1 expresado por la célula de los aspectos anteriores es del serotipo Ogawa. Todavía más preferiblemente, el 10-40% del antígeno O1 expresado por la célula de los aspectos anteriores es del serotipo Ogawa. Lo más preferiblemente, el 10-30% del antígeno O1 expresado por la célula de los aspectos anteriores es del serotipo Ogawa.

15 Preferiblemente, la célula de los aspectos anteriores expresa además una o más proteínas de factor de colonización (CF) de ETEC, tales como CFA/I, CS2 o CS5, en la que dicha(s) proteína(s) de CF se expresa(n) o bien como fimbrias únicas, dobles o bien híbridas.

20 En un noveno aspecto, se proporciona un método para fabricar una vacuna, que comprende las etapas de:

proporcionar una célula de *Vibrio cholerae* O1 que comprende antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba; e

25 inactivar dicha célula.

Preferiblemente, la inactivación se realiza mediante tratamiento con formalina o mediante tratamiento térmico.

Preferiblemente, la célula es una célula según los aspectos séptimo u octavo.

30 En un décimo aspecto (no parte de la invención reivindicada), la presente descripción también describe un kit para su uso en la vacunación formulado como una composición unitaria, por lo cual la composición se presenta en una parte del kit e instrucciones para su uso en otra parte.

### Descripción detallada de la invención

35 Vacuna que comprende células con antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba

40 Aunque *V. cholerae* del serogrupo O139 también puede provocar cólera, >98% de todos los casos de cólera a nivel mundial están provocados por *V. cholerae* O1. El serogrupo O1 tiene dos subtipos/serotipos, Ogawa e Inaba. El cambio de serotipo del subtipo Ogawa al Inaba se produce a una frecuencia relativamente alta mientras que la conversión recíproca es poco común. La base del cambio de serotipo es una mutación en la ruta de síntesis de LPS que conduce a un cambio en la estructura del antígeno O1. Una vacuna eficaz necesita incluir las cepas tanto Ogawa como Inaba en su composición puesto que sus LPS son serológicamente distintos con epítomos tanto compartidos como distintos que contribuyen a la protección.

45 Se da a conocer una vacuna que comprende células de *Vibrio cholerae* O1 que expresan antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba, y tiene la ventaja de simplificar la producción porque obvia la necesidad de usar células distintas para cada uno de los fenotipos en la producción de la vacuna. Al permitir el uso de un único tipo de célula, la producción de la vacuna también se simplifica, puesto que solamente se necesita un tipo de tratamiento de inactivación.

50 La inmunización con la vacuna de la invención basada en cepas individuales de *V. cholerae* que expresan diferentes cantidades de los serotipos tanto Ogawa como Inaba da lugar a anticuerpos de reacción cruzada así como específicos de tipo en antígenos tanto Ogawa como Inaba (véase el ejemplo 1).

55 En promedio, el 10-90% de los antígenos O1 de las células son del serotipo Ogawa. El antígeno Inaba está presente preferiblemente en una mayor cantidad (lo que quiere decir más del 50%) que el antígeno Ogawa, puesto que el antígeno Inaba puede provocar un determinado nivel de protección de serotipo cruzado contra Ogawa, mientras que el antígeno Ogawa sólo puede provocar protección contra sí mismo.

60 La eficacia de la vacuna frente a ETEC puede mejorarse adicionalmente mediante la incorporación de la característica de que las células expresen además una o más proteínas de factor de colonización (CF) de ETEC, tales como CFA/I, CS2 o CS5, en la que dicha(s) proteína(s) de CF se expresa(n) o bien como fimbrias únicas, dobles o bien híbridas (véanse los detalles a continuación).

65 Es preferible que la vacuna anterior no contenga ninguna célula completa inmunológicamente activa adicional

además de células de *Vibrio cholerae* O1 que comprenden antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba. Sin embargo, la vacuna anterior puede comprender además CTB recombinante de manera similar a Dukoral™.

5 La vacuna es preferiblemente para administración oral, pero también puede administrarse mediante inyección. Preferiblemente, la vacuna comprende células de *Vibrio cholerae* O1 que comprenden antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba que están inactivados con formalina.

10 Preferiblemente, la vacuna comprende células de *Vibrio cholerae* O1 genéticamente modificadas, preferiblemente células de *Vibrio cholerae* O1 genéticamente modificadas tales como se describe a continuación.

15 La vacuna de la invención puede ser una composición de vacuna que comprende uno o más excipientes, portadores, diluyentes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

20 Los expertos en la técnica conocen bien la formulación de composiciones de vacuna según la invención. Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, cargas, portadores sólidos, disoluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos convencionales, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica, y se describe, a modo de ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Company, Pensilvania, EE.UU. Salvo en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones.

25 La composición de vacuna para uso oral puede comprender preferiblemente  $10^8$ - $10^{14}$  células/ml, más preferiblemente  $10^{10}$ - $10^{12}$  célula por ml y lo más preferiblemente  $10^{11}$  células/ml aproximadamente.

La composición de vacuna para uso oral puede formularse como un producto alimenticio, una bebida o un complemento alimenticio (cuando se usa para inmunizar animales).

30 La composición de vacuna puede comprender un adyuvante conocido en la técnica, o puede carecer de cualquier adyuvante.

#### Uso de la vacuna

35 La presente invención da a conocer el uso de la vacuna anterior en inmunización preventiva, preferiblemente contra el cólera y/o infección por *Escherichia coli* enterotóxica (ETEC). Preferiblemente, la vacuna se administra por vía oral o por vía sublingual.

40 La administración también puede realizarse mediante inyección.

La vacuna se usa preferiblemente para inmunizar seres humanos y otros mamíferos, tales como mascotas (gatos, perros y similares) o animales de granja (tales como vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos y similares).

45 Preferiblemente, la vacuna se administra por vía oral a  $10^8$ - $10^{14}$  células por dosis, más preferiblemente  $10^{10}$ - $10^{12}$  células por dosis y lo más preferiblemente  $10^{11}$  células por dosis aproximadamente.

50 El protocolo de inmunización puede consistir en una única administración o puede comprender dos o más administraciones. En una realización preferida, el protocolo de inmunización inicial para inducir inmunidad protectora comprende una primera administración y una segunda administración, separadas en el tiempo por al menos 7 días pero por no más de aproximadamente 2 meses. Tras el protocolo de inmunización inicial, puede mantenerse la inmunidad protectora tanto como se desee mediante administraciones de refuerzo que se producen con intervalos de menos de 3 años, preferiblemente intervalos de menos de 2 años. Puede ser preferible que una administración de refuerzo no tenga lugar antes de que haya transcurrido al menos 1 año desde la primera administración.

#### 55 **Método de producción de una vacuna**

Se da a conocer un método para fabricar una vacuna, que comprende las etapas de:

60 a. proporcionar una célula de *Vibrio cholerae* O1 que comprende antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba; y

b. inactivar dicha célula, tal como mediante tratamiento con formalina o mediante tratamiento térmico.

65 Preferiblemente, la inactivación se realiza mediante tratamiento con formalina. Preferiblemente la célula es una célula genéticamente modificada, preferiblemente tal como se describe a continuación.

Además de tener de la ventaja de permitir el uso de un único método de inactivación, la vacuna puede fabricarse usando protocolos convencionales conocidos, por ejemplo, de la producción de Dukoral™.

5 Células genéticamente modificadas útiles para la fabricación de vacunas y constructos de ADN para obtener tales células

10 Las células de *Vibrio cholerae* que comprenden antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba comprendidas en la vacuna, podrían obtenerse, en principio, de una cepa que se produce de manera natural que tiene un fenotipo Hikojima. Sin embargo, hasta donde conocen los inventores, tales cepas son muy poco comunes y no están disponibles actualmente tales cepas para el público. En la bibliografía, también se han descrito tales cepas naturales como inestables, lo que las hace menos prometedoras para la producción industrial de vacunas.

15 Por tanto, los inventores han derivado células de *V. cholerae* que expresan antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba por medio de ingeniería genética y han obtenido cepas novedosas con fenotipo Hikojima estable. Las células derivadas de esta manera también tienen la ventaja de que puede usarse cualquier cepa deseada (tal como una cepa de vacuna conocida y bien caracterizada) como punto de partida, simplificando sustancialmente la producción y racionalizando los experimentos necesarios para la producción con BPF y la aprobación reguladora.

20 Los inventores demuestran en el presente documento que el parámetro clave para obtener el fenotipo Hikojima deseado es obtener un nivel adecuado de la actividad enzimática de *WbeT*. Por adecuado en este contexto quiere decirse que el nivel de actividad enzimática de *WbeT* de la célula no es tan bajo que las células tengan un fenotipo Inaba esencialmente puro y no es tan alto que las células tengan un fenotipo Ogawa esencialmente puro.

25 En el contexto de la presente invención, el 10-90% de los antígenos O1 en las células son del tipo Ogawa (siendo el resto por consiguiente del tipo Inaba). Más preferiblemente, el 10-80% de los antígenos O1 en las células son del tipo Ogawa, aún más preferiblemente el 10-50%, todavía más preferiblemente el 10-40% y lo más preferiblemente el 20-30%.

30 Tal como se muestra en los ejemplos a continuación, puede obtenerse un fenotipo Hikojima adecuado tal como se describió anteriormente de manera resumida mediante varias estrategias distintas que utilizan tecnología de ADN recombinante:

35 a) una proteína *WbeT* mutante que tiene actividad enzimática baja puede expresarse a altos niveles en un huésped que tiene el fenotipo Inaba;

b) una proteína *WbeT* que tiene actividad enzimática alta puede expresarse a bajos niveles en un huésped Inaba; o

40 c) el gen *wbeT* endógeno de un huésped Ogawa puede mutarse, por ejemplo, por medio de recombinación homóloga para hacer que la proteína resultante tenga una actividad adecuadamente reducida.

45 d) El gen *wbeT* endógeno de un huésped Inaba puede reemplazarse o modificarse, por ejemplo, por medio de recombinación homóloga para hacer que la proteína producida por el gen tenga una actividad adecuadamente aumentada.

50 La presente divulgación da a conocer células obtenidas mediante cada una de las estrategias anteriores, así como constructos de ADN adecuados para obtener células mediante cada una de las estrategias anteriores. Sin embargo, tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas, sólo determinadas realizaciones de células son parte de la invención reivindicada en el presente documento como tal.

55 A partir de las enseñanzas en el presente documento, es evidente para el experto en la técnica que conseguir el nivel deseado de expresión de *WbeT* mediante las estrategias descritas anteriormente de manera resumida puede realizarse de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, los niveles de expresión de un transgén *WbeT* pueden modularse usando un promotor inducible (tal como *cat*, *lac* o *tac*) mediante el cual el nivel de expresión puede modularse durante el cultivo de las células huésped ajustando el nivel del inductor al que las células huésped están expuestas.

60 Alternativamente, también se conocen varios promotores inespecíficos débiles y fuertes y pueden usarse junto con una proteína *WbeT* adecuadamente modificada. Puede usarse un promotor débil para inducir de manera inespecífica un nivel muy bajo de expresión de una proteína *WbeT* altamente activa (tal como de tipo natural; SEQ ID NO: 6). En cambio, puede usarse un promotor inespecífico fuerte para inducir un nivel alto de expresión de una proteína *WbeT* que tiene una baja actividad (tal como una proteína *WbeT* mutada, preferiblemente tal como se describe a continuación).

65 Tanto plásmidos como transgenes *wbeT* integrados cromosómicamente pueden usarse en las células para lograr el

fenotipo deseado.

Muchas mutaciones diferentes de la proteína *WbeT* pueden dar como resultado potencialmente una proteína adecuadamente activa, y tales variantes mutadas puede obtenerlas fácilmente el experto en la técnica usando métodos bien conocidos en la técnica mediante mera experimentación de rutina, basándose en las enseñanzas en el presente documento. Tanto si se obtiene una célula del fenotipo deseado expresando la proteína *WbeT* mutada o no, puede analizarse fácilmente por el experto en la técnica, usando, por ejemplo, los métodos dados a conocer en el ejemplo 5. Los inventores han identificado serina 158 en la proteína *WbeT* (SEQ ID NO: 6) como residuo adecuado para modular la actividad. Por tanto, las mutaciones comprenden preferiblemente una sustitución en la serina 158, más preferiblemente sustitución de serina 158 por glicina, prolina, valina, leucina, alanina, treonina, metionina, triptófano, arginina o fenilalanina. Lo más preferiblemente, la serina 158 se sustituye por glicina, prolina, treonina, fenilalanina o triptófano.

Proteína(s) de factor de colonización (CF) de ETEC

Tal como resulta evidente a partir de lo anterior, la vacuna de la invención (o más bien las células en las que se basa la vacuna) también puede comprender otras características potenciadas además de la expresión combinada de antígenos O1 del serotipo tanto Inaba como Ogawa. En particular, las células pueden expresar una o más proteínas de factor de colonización (CF) de ETEC, tales como CFA/I, CS2 o CS5, en las que dicha(s) proteína(s) de CF se expresa(n) o bien como fimbrias únicas, dobles o bien híbridas, tal como se demuestra en el ejemplo 7. La inclusión de tales proteínas de CF en las células de la vacuna es especialmente útil para inducir inmunidad protectora contra ETEC.

La expresión "que comprende" tal como se usa en el presente documento debe entenderse que incluye, pero no se limita a, los puntos establecidos.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que han de entenderse como no limitativos.

Ejemplo 1. Preparación y pruebas de una vacuna que comprende células de *Vibrio cholerae* que comprenden antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba

Se sometió a prueba si una vacuna que comprende bacterias de *V. cholerae* de la cepa JS1569 (Inaba) que se habían modificado genéticamente para expresar antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba daría lugar a una respuesta de anticuerpos con una proporción diferente de anticuerpos que reaccionan con LPS de Ogawa e Inaba en ELISA en comparación con la respuesta de anticuerpos tras la inmunización con la cepa Inaba JS1569 original.

Las bacterias del ejemplo 2 (véase a continuación) se inactivaron con formalina y se usaron para la inmunización. Se realizó la inactivación con formalina de bacterias y las inmunizaciones orales y los métodos de ensayo tal como se describió anteriormente (Nygren E, Li BL, Holmgren J, Attridge SR. Infect Immun. Agosto de 2009; 77(8):3475-84). Resumidamente, se inmunizaron ratones Balb/c en 3 rondas a intervalos de 2 semanas con dos dosis diarias de  $3 \times 10^8$  células inactivadas con formalina (junto con un adyuvante para la cepa *WbeT*), y una semana tras la última inmunización se sacrificaron los ratones y se recogió suero y se sometió a prueba para obtener los títulos de anticuerpo IgG/IgM combinados en placas de ELISA recubiertas con LPS o bien de Inaba o bien de Ogawa.

Los resultados se presentan en la tabla a continuación y muestran en contraposición a la cepa Inaba JS1569 original que dio lugar a una respuesta de anticuerpos con un título anti-Inaba ligeramente más alto que anti-Ogawa, la vacuna *Wbe S158S* de tipo natural/JS1569 dio lugar a una respuesta de anticuerpos con un título anti-Ogawa mucho más alto que anti-Inaba, aunque todavía dio lugar a una modesta formación de anticuerpos anti-Inaba específicos:

| Suero inmunológico                               | Títulos de Inaba/Ogawa (razón) |
|--|--------------------------------|
| Frente a JS1569                                  | 10290/5060 (2:1)               |
| El mismo absorbido con Ogawa                     | 2940/160 (18:1)                |
| Frente a <i>Wbe S158S</i> de tipo natural/JS1569 | 36000/365000 (1:10)            |
| El mismo absorbido con Inaba                     | 1600/49000 (1:30)              |
| El mismo absorbido con Ogawa                     | 1700/2500 (1:1,5)              |

Estos hallazgos se confirmaron cuando se administraron inmunizaciones por vía subcutánea sin adyuvante. En una marcada diferencia con respecto a la inmunización con la cepa Inaba JS1569 original y más similar a la inmunización con la cepa de referencia Ogawa A457, la inmunización con JS1569 *WbeT* dio lugar a suero inmunológico con una fuerte proporción de anticuerpos específicos de Ogawa, tal como se muestra en la tabla a continuación.

| Suero inmunológico | Título de Inaba | Título de Ogawa | Razón de Inaba/Ogawa |
|--------------------|-----------------|-----------------|----------------------|
|--------------------|-----------------|-----------------|----------------------|



|  |     |      |       |
|--|-----|------|-------|
| JS1569 Inaba                           | 480 | 260  | 1,8:1 |
| JS1569 abs con Ogawa A457              | 180 | 60   | 3:1   |
| JS1569 abs con 1569 <i>WbeT</i>        | 240 | 60   | 4:1   |
| A457 Ogawa                             | 660 | 1940 | 1:1,9 |
| A457 abs con Inaba 1569                | 240 | 1020 | 1:4,3 |
| A457 abs con JS1569 <i>WbeT</i>        | 180 | 40   | 1,8:1 |
| JS1569 <i>WbeT</i>                     | 420 | 1580 | 1:3,8 |
| <i>WbeT</i> abs con Ogawa A457         | 150 | 60   | 2,5:1 |
| <i>WbeT</i> abs con Inaba JS1569       | 180 | 920  | 1:5,1 |
| <i>WbeT</i> abs con JS1569 <i>WbeT</i> | 120 | 100  | 1,2:1 |

Ejemplo 2: Células de *Vibrio cholerae* genéticamente modificadas que expresan antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba mediante la expresión de proteína *WbeT* mutada: expresión basada en plásmidos de proteína *WbeT* mutada

5 En una única entrada en GenBank del gen *wbeT* de una cepa Hikojima hay una mutación que convierte una serina en prolina en la posición 158 de la proteína (S158P) aunque la misma mutación se ha descrito en una cepa identificada como perteneciente al serotipo Inaba (números de registro de GenBank FJ619106 y DQ401028, respectivamente). Habiendo amplificado el gen *wbeT* de tipo natural a partir de la cepa O1 El Tor Ogawa VX44945 con los cebadores *wbeT*1 EcoRI (SEQ ID NO: 1 5'-CCCGGTCTCGAATTC CTGCATCTGCAAGTTGATTCTGTATG-3') y *wbeT*2 HindIII (SEQ ID NO: 2 5'-CCCGGTCTCAAGCTTATAGTGAAGTCTTCGGAAATGTCTG-3'), se digirió con Eco31I y se clonó en un vector de expresión derivado de pAF1 ( ) en el que el gen clonado se colocó bajo el control del promotor *tac* de síntesis potente que se había digerido con EcoRI y HindIII. La secuencia del gen se confirmó mediante secuenciación de ADN del plásmido con los cebadores *wbe1* (SEQ ID NO: 3 5'-CTGCATCTGCAAGTTGATTCTGTATG-3') y *wbe2* (SEQ ID NO: 4 5'-ATAGTGAAGTCTTCGGAAATGTCTG-3').

15 La secuencia de ADN del gen *wbeT* de tipo natural se muestra en SEQ ID NO: 5 mientras que la proteína de tipo natural se muestra en SEQ ID NO: 6.

20 La secuencia completa del plásmido (pML-*wbeTtac*) que expresa *wbeT* de tipo natural se muestra en SEQ ID NO: 7.

25 Para construir la biblioteca de mutantes de *wbeT* que porta mutaciones en la posición de aminoácido 158 del producto génico, se sintetizaron los oligonucleótidos *wbeT* m3 (SEQ ID NO: 8 5'-GCGCGCCAGAAGTTGGCTATTTTTAACC-3') y *wbeT* m1 (SEQ ID NO: 9 5'-GGGGGTTTCGAAGTTTATGAGTTTGATAATAGGGTGNNBTCATTATTTTTCAAAAAAATACA GACATAGCAGATAAGGTTAAAAATAGCCAAGTTCTGGCGCGC-3'). Los dos oligonucleótidos se mezclaron en cantidades equimolares y se permitió que hibridaran a temperatura ambiente durante la noche. Se preparó ADN bicatenario de longitud completa mediante extensión del cebador corto *wbeT* m3 usando ADN polimerasa de T4 en presencia de trifosfatos de desoxirribonucleótido en exceso. El fragmento resultante se digirió con Bsp119I y Van91I y se ligó en pML-*wbeTtac* (SEQ ID NO: 7) digerido con las mismas enzimas. El ADN ligado se usó para transformar la cepa de *E. coli* electrocompetente obtenida comercialmente DH12S (Invitrogen). Tras la incubación sin selección con antibiótico, se extendió una pequeña alícuota de las células sobre una plaga de agar LB selectivo complementado con ampicilina (100 µg/ml). El resto de las células se diluyó hasta 25 ml con caldo LB nuevo. Se añadió ampicilina hasta una concentración final de 100 µg/ml y se hizo crecer el cultivo durante la noche a 37°C para obtener una biblioteca de clones.

35 Se complementaron alícuotas del cultivo resultante con glicerol hasta una concentración final del 17% y se almacenaron a -70°C. Se usaron otras alícuotas para preparar ADN de plásmido.

40 Se recogieron las colonias obtenidas sobre la placa de agar LB sobre una nueva placa y se cultivaron las colonias para preparar ADN de plásmido. Los plásmidos se secuenciaron para determinar si los genes *wbeT* portaban mutaciones. Los mutantes de *wbeT* obtenidos a partir de la biblioteca son los siguientes: S158G, S158P, S158V, S158I, S158L, S158A, S158T, S158M, S158W, S158R, S158C y S158F. Adicionalmente, se aislaron el gen de tipo natural y un gen con la señal de terminación TGA en la posición 158.

45 Se aislaron los diferentes plásmidos y usaron para transformar la clásica cepa Inaba O1 JS1569. Esta cepa tiene un gen *wbeT* mutante cambiándose la glicina (GGA) en la posición 219 de la proteína a un codón de terminación (TGA) dando como resultado un producto truncado e inactivo (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11).

50 Hay otros polimorfismos que no parecen tener ninguna importancia.

55 Las diferentes cepas generadas por la introducción de los diferentes plásmidos recombinantes expresaron diferentes niveles del antígeno Ogawa cuando se hicieron crecer en condiciones inductoras (en presencia de IPTG 1 mM). El fenotipo se evaluó basándose en ensayos de aglutinación y en algunos casos usando ELISA de inhibición (véase el ejemplo 5 para la descripción de materiales y métodos). El gen de tipo natural dio lugar a un cambio de serotipo casi

total mientras que otros (tales como S158P y S158G) dieron aglutinación leve pero detectable con antisuero específico de Ogawa así como aglutinación con un antisuero específico de Inaba (y, por tanto, confirieron un serotipo Hikojima). Algunos mutantes no tenían actividad detectable con antisuero específico de Ogawa (S158I y S158C) y aún otros dieron aglutinación intermedia (S158T, S158F y S158W).

Los resultados demuestran inequívocamente que las mutaciones, y específicamente mutaciones en la posición 158 del producto del gen *wbeT*, dan como resultado proteínas con actividad enzimática alterada. En la actualidad no hay ningún ensayo fiable para determinar cuantitativa y directamente los niveles de actividad enzimática de estos mutantes en comparación con el tipo natural, pero el resultado final relevante puede evaluarse fácilmente como en el ejemplo 5. En resumen, todos excepto S158C y S158I pudieron complementar el fenotipo Inaba de la cepa huésped en cierta medida.

Ejemplo 3: Células de *Vibrio cholerae* genéticamente modificadas que expresan antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba mediante la expresión de proteína *WbeT* mutada: inserción cromosómica de *wbeT* mutante

Se substituyó el gen *wbeT* cromosómico truncado en la cepa JS1569 por los genes mutantes generados en el ejemplo 2. Se amplificaron los genes mutados relevantes con los cebadores *wbeT*1 BglII (SEQ ID NO: 1) y *wbeT*2 BglII (SEQ ID NO: 2). Se digirieron los fragmentos ampliados con BglII y se ligaron en el vector suicida pMT-SUICIDE (SEQ ID NO: 12) que se había digerido con BamHI. Éste es un vector suicida basado en R6K pequeño construido en este laboratorio por M. Lebens que porta el gen de resistencia a cloranfenicol y el origen de transferencia (*oriT*) del plásmido de amplio intervalo del huésped RP4 que permite que el plásmido se transfiera de manera conjugativa a la cepa de *V. cholerae* con la ayuda de un plásmido auxiliar (pNJ5000; Grinter NJ, Gene. Enero-febrero de 1983; 21(1-2):133-43).

En los clones que se generaron, ambos genes *wbeT* (S158G y el tipo natural) se insertaron con los genes clonados en la orientación contraria al gen *cat*. La secuencia de tal vector se ejemplifica por SEQ ID NO: 13 (que porta el gen *wbeT* de tipo natural; el constructo para S158G es idéntico salvo por los nucleótidos que codifican para el residuo 158 de *WbeT*).

Los plásmidos resultantes se aparearon en la cepa JS1569 y se seleccionaron basándose en la resistencia a cloranfenicol y rifampicina. Puesto que el plásmido no tiene contraselección para la pérdida del plásmido, su inserción en el cromosoma mediante recombinación homóloga da como resultado copias en tándem del gen *wbeT* separadas por el plásmido. Según dónde se produjo la recombinación, los clones tenían diferentes fenotipos (véase el ejemplo 5).

La cepa que había recibido el gen de tipo natural (1342) tenía un fenotipo Hikojima claro. El ELISA de inhibición mostró que se expresaba solamente el 15% del LPS de Ogawa presente en la superficie de la cepa que recibió el mutante S158G. Esta última cepa (1356) era en efecto una cepa Ogawa que se aglutinaba fuertemente con antisuero específico de Ogawa, pero nada en absoluto con el antisuero específico de Inaba.

Sin embargo, las cepas eran muy estables; retenían sus serotipos de LPS y permanecían resistentes a cloranfenicol incluso en ausencia de selección, lo que indicaba que el plásmido no se perdía fácilmente.

La PCR y secuenciación usando los cebadores *wbe1* y 2 (SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente) mostraron que había dos genes en las cepas que variaban en los sitios de variación entre el gen presente en el huésped y el que se había introducido. La amplificación y secuenciación con los cebadores *wbeT*for 87> (SEQ ID NO 14: 5'-CGGTGCAAACGTTGGAACCTTCTG-3') y *wbeT* rev 51< (SEQ ID NO 15: 5'-GGAAAACAATGCCATCCAAATTCGC-3') que sólo permiten la amplificación si hay copias en tándem del gen *wbeT* ampliaron con éxito el extremo 3' del gen proximal (a partir del aminoácido 87) y el extremo 5' del gen distal hasta el aminoácido 51 y el plásmido entremedias. La secuenciación usando el cebador *wbeT*for 87> mostró que en la cepa 1342 el gen *wbeT* adyacente al promotor nativo era el gen del huésped truncado. El gen distal tenía la secuencia de tipo natural pero no el promotor. Esta disposición condujo al fenotipo Hikojima puesto que el gen de tipo natural estaba expresándose a niveles extremadamente bajos a partir de un promotor críptico.

En la cepa Ogawa 1356 la disposición era diferente. La recombinación había dado como resultado que se expresara el gen *wbeT* nativo a partir del promotor nativo y que el gen S158G mutante se colocara distalmente y, por tanto, que no hubiera ningún promotor reconocible en absoluto. Ambas copias del gen parecen haber perdido el codón de terminación en la posición 219, pero esta mutación no tuvo ninguna influencia aparente sobre el fenotipo.

Ejemplo 4: Células de *Vibrio cholerae* genéticamente modificadas que expresan antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba expresando niveles bajos de proteína *WbeT* nativa

Junto con los experimentos sobre *wbeT* mutante descritos en el ejemplo 2, se indicó que un plásmido de control que porta *wbeT* de tipo natural pudo complementar parcialmente el gen mutante en la cepa JS1569 incluso cuando no se inducía. Esto dio como resultado un serotipo Hikojima incluso en presencia del gen de tipo natural demostrando que el fenotipo también puede lograrse limitando los niveles de expresión; en este caso, manteniendo el promotor *tac*

reprimido y permitiendo únicamente una expresión de avance que se produce en ausencia de inductor.

En el ejemplo 3, el clon 1342 tenía un gen de tipo natural integrado cromosómicamente expresado a partir de un promotor críptico, que dio como resultado un serotipo Hikojima. Estos resultados confirman que la expresión del gen de tipo natural a niveles muy bajos puede dar como resultado el serotipo Hikojima.

Ejemplo 5: Caracterización del fenotipo de células de *Vibrio cholerae* genéticamente modificadas

Se hicieron crecer bacterias de *V. cholerae* de la cepa JS1569 (Inaba) que se habían modificado para contener plásmidos que codifican para o bien la proteína metilasa *WbeT* de tipo natural (cepa JS1569/S158S) o un gen *wbeT* mutado que codifica para la proteína *WbeT* con una mutación en la posición 158 de S a G (JS1569/S158G) o de S a A (JS1569/S158A) sobre placas de agar LB, y se sometieron a prueba colonias individuales para determinar la aglutinación por anticuerpos específicos para los antígenos O Inaba y Ogawa, respectivamente.

Estos anticuerpos se obtuvieron tras inmunizar en primer lugar conejos con LPS de Ogawa y de Inaba purificado, respectivamente y después absorber extensamente los sueros con bacterias inactivadas con formalina del serotipo heterólogo para retirar anticuerpos de reacción cruzada. Tras la absorción, el antisuero específico de Ogawa dio una fuerte aglutinación de células de *V. cholerae* de referencia del serotipo Ogawa pero no pudo aglutinar células Inaba y viceversa para el suero específico de Inaba.

Se realizaron pruebas de aglutinación mediante un método convencional. Resumidamente, se suspendió una única colonia de una placa nueva de la cepa sometida a prueba en 50-100 µl de tampón de solución salina fisiológica, y se colocaron 10 µl de la suspensión sobre un portaobjetos de microscopio. Entonces, se añadieron 10 µl de antisuero específico adecuadamente diluido y se mezcló con las células inclinando el portaobjetos hacia atrás y hacia delante durante hasta 5 minutos hasta que la aglutinación era claramente visible. Se comparó cada ensayo con controles negativos y positivos que consistían en células de las cepas Inaba y Ogawa de referencia.

Adicionalmente, se realizó un control para determinar la aglutinación espontánea en el que el suero se reemplazó por tampón para cada cepa sometida a prueba. Los resultados se muestran en la tabla a continuación y muestran que la cepa JS1569/S158S que contiene plásmido que codifica para la proteína *WbeT* de tipo natural había cambiado completamente el serotipo de Inaba a Ogawa, la cepa JS1569/S158G con una mutación *WbeT* 158S a G expresaba una fuerte reactividad frente a Ogawa pero también reactividad detectable frente a Inaba, y JS1569/S158A con una mutación *WbeT* 158S a A sólo tenía reactividad frente a Ogawa marginal.

| Cepa           | Plásmido que codifica para <i>WbeT</i> | Agglutinación con anticuerpo anti-Ogawa | Agglutinación con anticuerpo anti-Inaba |
|----------------|--|---|---|
| JS1569 Inaba   | Ninguno                                | -                                       | +++                                     |
| Cairo 50 Ogawa | Ninguno                                | +++                                     | -                                       |
| A457 Ogawa     | Ninguno                                | +++                                     | -                                       |
| JS1569/S158S   | <i>WbeT</i> S158S de tipo natural      | +++                                     | (+)                                     |
| JS1569/S158G   | <i>WbeT</i> S158G                      | ++                                      | ++                                      |
| JS1569/S158A   | <i>WbeT</i> S158A                      | (+)                                     | +++                                     |

Estos resultados se confirmaron cuando se sometieron a prueba bacterias inactivas con formalina de las mismas cepas para determinar la aglutinación con los mismos sueros. También se confirmaron y se extendieron cuando las bacterias inactivadas con formalina se sometieron a prueba para determinar su expresión cuantitativa de antígenos Inaba y Ogawa sobre la superficie bacteriana usando un método de ELISA de inhibición. El método se realizó tal como sigue a continuación: se recubrieron placas Greiner Bio-one de alta unión con LPS de Ogawa incubando durante la noche con 100 µl por pocillo de una disolución de 5 µg/ml de LPS de Ogawa purificado en PBS. Empezando con 200 microlitros de bacterias inactivadas con formalina de DO<sub>600</sub> 1,00; se hicieron siete diluciones de cinco veces en serie (hasta 1:15625) en PBS con un octavo tubo de blanco que no contenía células. Se mezclaron entre sí 150 microlitros de cada dilución con una cantidad igual de suero anti-Ogawa adecuadamente diluido en PBS, BSA al 0,2%. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 1 hora sin agitación. Las placas recubiertas se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con 200 µl/pocillo de PBS, BSA al 0,1% durante 30 minutos a 37°C. Las células se retiraron de las suspensiones mediante centrifugación durante 5 minutos a 20.000 x g y se añadieron 100 microlitros de los sobrenadantes a la(s) placa(s) bloqueada(s). Se incluyó un blanco que contenía PBS, BSA al 0,1% sin células ni suero anti-Ogawa en todas las placas y se ejecutaron todas las muestras por duplicado. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente y entonces se lavaron tres veces con PBS, Tween 20 al 0,05%. Se añadieron 100 microlitros de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo adecuadamente diluido en PBS, BSA al 0,1%, Tween 20 al 0,05% a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa tres veces con PBS, Tween 20 al 0,05% antes de añadir la disolución de sustrato de ortofenilendiamina (OPD) al 0,1% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,012% en citrato 0,1 M pH 4,5. Se leyó la absorbancia a 490 nm tras 10 min.

Se extrapola la dilución bacteriana que dio como resultado el 50% de inhibición y también la inhibición en porcentaje

de la absorbancia a la dilución bacteriana de 1:25 con los resultados mostrados en la tabla a continuación. Los resultados muestran que la cepa JS1569/S158S que contenía un gen *wbeT* que codifica para *WbeT* de tipo natural podía inhibir eficazmente el suero anti-Ogawa específico, mientras que las cepas que contenían genes *wbeT* con mutaciones individuales también podían inhibir el suero anti-Ogawa con actividad intermedia (JS1569/S158G) o simplemente detectable (JS1569/S158A):

| Cepa         | Dilución para el 50% de inhibición | % de inhibición a la dilución 1:25 |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------|
| JS1569 Inaba | << 1:1                             | 0                                  |
| A457 Ogawa   | 1:60                               | 65                                 |
| JS1569/S158G | 1:70                               | 70                                 |
| JS1569/S158S | 1:1                                | 20                                 |

Basándose en los plásmidos que codifican para *WbeT* y S158G, respectivamente, se obtuvieron dos cepas derivadas recombinantes de JS1569, 1356 (*WbeT* de tipo natural) y 1342 (S158G *WbeT*), cuando el gen *wbeT* mutado se había insertado de manera estable en el cromosoma, dando fenotipos inesperados pero estables. Para la explicación y descripción de estas cepas, véanse los ejemplos anteriores. Estas cepas y cepas de referencia adecuadas se sometieron a transferencia de colonias para evaluar la expresión de Ogawa. Se tomaron pequeñas extensiones de las cepas que contenían genes *wbeT* mutados sobre una placa de agar LB junto con cepas de control de Inaba y Ogawa y se cultivaron durante la noche a 37°C. Se aplicó una membrana de nitrocelulosa humedecida con PBS sobre la placa con las colonias hechas crecer y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se dejó que la membrana se secase sobre un trozo de papel durante 5 minutos antes de bloquearla dos veces durante 20 minutos en 10 ml de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS a temperatura ambiente. Se descartó el líquido de bloqueo y se reemplazó con una dilución apropiada del suero anti-Ogawa en 10 ml en PBS que contenía BSA al 0,1% y Tween 20 al 0,05%. Se incubó la membrana a temperatura ambiente sobre una mesa basculante durante 2 horas. Se lavó entonces la membrana tres veces con PBS que contenía Tween20 al 0,05% antes de añadir anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa del rábano (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en BSA al 0,1% en PBS con Tween 20 al 0,05% e incubando durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave.

Tras tres lavados adicionales en PSB, Tween 20 al 0,05% y un único lavado con PBS solo, se reveló la membrana durante 15 minutos con 4-cloro-1-naftol al 0,05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,015% en Tris-HCl 20 mM pH 7,5 que contenía NaCl 500 mM y metanol al 16,7%. Se lavó entonces concienzudamente con agua del grifo y se dejó secar sobre un trozo de papel. Se tomó una fotografía digital de la membrana revelada y se midió la densidad de tinción con un sistema informático.

Los resultados en la tabla muestran que la cepa 1356 expresaba casi tanto antígeno Ogawa como la cepa de referencia Ogawa mientras que la cepa 1342 expresaba cantidades sustancialmente menores de antígeno Ogawa. Estos hallazgos se confirmaron adicionalmente cuando se sometieron a prueba preparaciones de las cepas inactivadas con formalina para determinar la expresión cuantitativa de antígeno Ogawa mediante ELISA de inhibición realizado tal como se describió anteriormente tal como también se muestra en la tabla:

| Cepa         | Unidades de densidad de transferencia puntual/mm <sup>2</sup> | Dilución para el 50% de inhibición |
|--------------|---|------------------------------------|
| A 457 Ogawa  | 12700   | 1:60                               |
| JS1569 Inaba | 0   | <<1:1                              |
| 1356         | 10000   | 1:80                               |
| 1342         | 4500  | 1:7                                |

Ejemplo 6: Modificación genética del gen *wbeT* endógeno para obtener el serotipo Hikojima

Aunque las cepas presentadas en los ejemplos anteriores son estables y tienen claramente los fenotipos deseados, una manera alternativa de obtener un fenotipo Hikojima es realizar verdaderas sustituciones génicas en el gen endógeno. Mutaciones adecuadas (tal como se dio a conocer anteriormente) en la posición 158 del producto del gen *wbeT* activo, endógeno también dieron como resultado actividad disminuida y, por tanto, un serotipo Hikojima. Esto dará como resultado un intervalo de mutantes con niveles diferentes de expresión de Ogawa que pueden someterse a prueba para determinar la expresión de Hikojima como en el ejemplo 5 y en experimentos de inmunización para determinar las propiedades inmunogénicas óptimas.

Tal como se mencionó, el vector pMT-SUICIDE carece de un gen de contraselección adecuado y ha demostrado que es difícil aislar derivados que han perdido el plásmido y mantienen el fenotipo y gen deseados. Por este motivo, se construyó un nuevo vector suicida que portaba el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que permite que las cepas que han perdido el plásmido se aíslen mediante selección en placas que contienen sacarosa puesto que la expresión del producto del gen *sacB* en bacterias Gram-negativas es mortal y solamente sobrevivirán colonias derivadas de células que han perdido el plásmido debido a recombinación homóloga entre las dos copias del gen *wbeT*. El plásmido, pMT Suicide/sacB (SEQ ID NO: 16) es mucho más pequeño que los plásmidos comparables con las

mismas funciones y es mucho más fácil de usar.

El tipo natural y varios genes *wbeT* mutantes se han clonado en un nuevo vector y se aparearán en la cepa JS1569 como antes, así como con otras cepas tales como una cepa Ogawa adecuada.

5 Para optimizar las oportunidades de obtener un clon correcto, se analizará la disposición génica de los diploides parciales que resultan de los experimentos de transconjugación antes de que se elija una cepa candidata para la selección adicional de cepas que han eliminado por recombinación el plásmido.

10 Ejemplo 7: Expresión de CFA/I+CS2 híbrido

Se ha demostrado recientemente que las cepas *E. coli* TOP10 y *V. cholerae* JS1569 pueden expresar uno de los factores de colonización principales de ETEC, es decir fimbrias CFA/I, en su superficie (Tobias J, Lebens M, Bölin I, Wiklund G, Svennerholm AM. *Vaccine*. 6 de febrero de 2008; 26(6):743-52). Tras la electroporación de un vector de expresión que contiene CFA/I en las cepas anteriores, se detectó la expresión de superficie mediante ensayo de transferencia puntual.

También se ha demostrado recientemente que *E. coli* TOP10 puede expresar fimbrias híbridas que contienen las subunidades principales de tanto CFA/I como CS2, es decir, un factor de colonización factor principal adicional de ETEC (Tobias J, Svennerholm AM, Holmgren J, Lebens M. *Appl Microbiol Biotechnol*. Julio de 2010; 87(4)).

Por tanto, se examinó la viabilidad de la expresión de las mismas fimbrias híbridas en la cepa de *V. cholerae* JS1569. La cepa se electroporó con el vector de expresión pJT-CFA/I-CotA tal como se describió (Tobias *et al.* 2008, citado anteriormente; Tobias J, Holmgren J, Hellman M, Nygren E, Lebens M, Svennerholm AM. *Vaccine*. 20 de agosto de 2010. [Publicación electrónica antes de la edición impresa]).

Entonces, se cultivaron en estría cincuenta colonias (clones) en dos placas LB complementadas con cloranfenicol (12,5 µg/ml) e IPTG (1 mM), seguido por incubación durante la noche a 37°C. Se aplicaron entonces anticuerpos monoclonales (MAb) específicos 1:6 contra CFA/I y MAb 10:3 contra CS2 en el ensayo de transferencia de colonias (Tobias *et al.*, 2010, citado anteriormente) para examinar la expresión de superficie de las fimbrias CFA/I-CotA híbridas en *V. cholerae* JS1569. Entonces se revelaron las transferencias y mostraron una señal positiva de expresión de superficie de las fimbrias CFA/I-CS2 híbridas en los cincuenta clones sometidos a prueba de *V. cholerae* JS1569.

Por tanto, es posible combinar la expresión de fimbrias híbridas antigénicas en las mismas células que se han diseñado por ingeniería para expresar antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba.

**Lista de secuencias**

40 <110> Gotovax AB  
Holmgren, Jan  
Lebens, Michael

45 <120> Vacuna frente a la diarrea debida a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y el cólera

<130> P40903745PCT00

<150> Documento US 61/272351

50 <151> 16-09-2009

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

55 <210> 1

<211> 41

<212> ADN

<213> *Vibrio cholerae*

60 <400> 1

cccggtctcg aattctgca tctgcaagtt gattctgtat g

41

<210> 2

<211> 40

65 <212> ADN

<213> *Vibrio cholerae*

# ES 2 616 912 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <400> 2   |    |
|    | cccggctca agcttatagt gaactctcg gaaatgtctg                         | 40 |
| 5  | <210> 3<br><211> 26<br><212> ADN<br><213> <i>Vibrio cholerae</i>  |    |
| 10 | <400> 3<br>ctgcatctgc aagtgattc tgtatg                            | 26 |
| 15 | <210> 4<br><211> 25<br><212> ADN<br><213> <i>Vibrio cholerae</i>  |    |
| 20 | <400> 4<br>atagtgaact ctcggaaat gtctg                             | 25 |
| 25 | <210> 5<br><211> 953<br><212> ADN<br><213> <i>Vibrio cholerae</i> |    |
| 30 | <220><br><221> CDS<br><222> (67)..(927)                           |    |
|    | <400> 5   |    |

ES 2 616 912 T3

cctgcacatctg caagttgatt ctgtatgtta ttttttaacgc taatattatt taaaattgag 60

gtagta atg aaa cat cta ata aaa aac tat gta caa aaa tta att aaa 108  
Met Lys His Leu Ile Lys Asn Tyr Val Gln Lys Leu Ile Lys  
1 5 10

aca gag ctt gat gct att cag tca aag tct gtt cat gat aat cga aac 156  
Thr Glu Leu Asp Ala Ile Gln Ser Lys Ser Val His Asp Asn Arg Asn  
15 20 25 30

ttc att tac aat gga gag ttt tta att ctt gaa agc gaa ttt gga tgg 204  
Phe Ile Tyr Asn Gly Glu Phe Leu Ile Leu Glu Ser Glu Phe Gly Trp  
35 40 45

cat tgt ttt ccc aga gtg cag ttg aac cat gct tta agc tac aaa aac 252  
His Cys Phe Pro Arg Val Gln Leu Asn His Ala Leu Ser Tyr Lys Asn  
50 55 60

cca aac ttt gat tta ggt atg cgt cac tgg att gtt aat cat tgt aag 300  
Pro Asn Phe Asp Leu Gly Met Arg His Trp Ile Val Asn His Cys Lys  
65 70 75

cat gac acc act tat att gat atc ggt gca aac gtt gga act ttc tgt 348  
His Asp Thr Thr Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Asn Val Gly Thr Phe Cys  
80 85 90

gga atc gct gct cgt cat att aca caa gga aaa att ata gcg ata gaa 396  
Gly Ile Ala Ala Arg His Ile Thr Gln Gly Lys Ile Ile Ala Ile Glu  
95 100 105 110

cca ctc aca gaa atg gaa aat agt att agg atg aat gtt caa tta aat 444  
Pro Leu Thr Glu Met Glu Asn Ser Ile Arg Met Asn Val Gln Leu Asn  
115 120 125

aat cca ctg gtt gag ttt cat cat ttt ggc tgt gca ata ggt gag aat 492  
Asn Pro Leu Val Glu Phe His His Phe Gly Cys Ala Ile Gly Glu Asn  
130 135 140

gaa ggg gaa aat att ttc gaa gtt tat gag ttt gat aat agg gtg tca 540  
Glu Gly Glu Asn Ile Phe Glu Val Tyr Glu Phe Asp Asn Arg Val Ser  
145 150 155

tca tta tat ttt caa aaa aat aca gac ata gca gat aag gtt aaa aat 588  
Ser Leu Tyr Phe Gln Lys Asn Thr Asp Ile Ala Asp Lys Val Lys Asn  
160 165 170

agc caa gtt ctg gtt aga aag tta agt agt tta gat ata tcg cct act 636  
Ser Gln Val Leu Val Arg Lys Leu Ser Ser Leu Asp Ile Ser Pro Thr  
175 180 185 190

aac tct gta gtt ata aaa att gat gct gaa ggc gca gaa ata gag ata 684  
Asn Ser Val Val Ile Lys Ile Asp Ala Glu Gly Ala Glu Ile Glu Ile  
195 200 205

tta aac cag att tac gaa ttc aca gaa aag cat aat gga att gaa tat 732  
Leu Asn Gln Ile Tyr Glu Phe Thr Glu Lys His Asn Gly Ile Glu Tyr  
210 215 220

tat att tgc ttt gaa ttt gca atg ggt cat ata cag agg tct aat aga 780  
Tyr Ile Cys Phe Glu Phe Ala Met Gly His Ile Gln Arg Ser Asn Arg  
225 230 235

act ttt gat gag att ttt aac ata ata aac tca aaa ttc gga agt aag 828  
Thr Phe Asp Glu Ile Phe Asn Ile Ile Asn Ser Lys Phe Gly Ser Lys  
240 245 250

ES 2 616 912 T3

gca tat ttt att cat cca tta tca tcc gct gaa cat cct gag ttt aat 876  
 Ala Tyr Phe Ile His Pro Leu Ser Ser Ala Glu His Pro Glu Phe Asn  
 255 260 265 270

aaa gca acg cag gat att aat ggg aat atc tgt ttt aaa tat gta tca 924  
 Lys Ala Thr Gln Asp Ile Asn Gly Asn Ile Cys Phe Lys Tyr Val Ser  
 275 280 285

taa aataatttaa tatattccgt atgtca 953

<210> 6

<211> 286

5 <212> PRT

<213> *Vibrio cholerae*

<400> 6

Met Lys His Leu Ile Lys Asn Tyr Val Gln Lys Leu Ile Lys Thr Glu  
 1 5 10 15

Leu Asp Ala Ile Gln Ser Lys Ser Val His Asp Asn Arg Asn Phe Ile  
 20 25 30

Tyr Asn Gly Glu Phe Leu Ile Leu Glu Ser Glu Phe Gly Trp His Cys  
 35 40 45

Phe Pro Arg Val Gln Leu Asn His Ala Leu Ser Tyr Lys Asn Pro Asn  
 50 55 60

Phe Asp Leu Gly Met Arg His Trp Ile Val Asn His Cys Lys His Asp  
 65 70 75 80

Thr Thr Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Asn Val Gly Thr Phe Cys Gly Ile  
 85 90 95

Ala Ala Arg His Ile Thr Gln Gly Lys Ile Ile Ala Ile Glu Pro Leu  
 100 105 110

Thr Glu Met Glu Asn Ser Ile Arg Met Asn Val Gln Leu Asn Asn Pro  
 115 120 125

Leu Val Glu Phe His His Phe Gly Cys Ala Ile Gly Glu Asn Glu Gly  
 130 135 140

Glu Asn Ile Phe Glu Val Tyr Glu Phe Asp Asn Arg Val Ser Ser Leu  
 145 150 155 160

Tyr Phe Gln Lys Asn Thr Asp Ile Ala Asp Lys Val Lys Asn Ser Gln  
 165 170 175

Val Leu Val Arg Lys Leu Ser Ser Leu Asp Ile Ser Pro Thr Asn Ser  
 180 185 190



ES 2 616 912 T3

Val Val Ile Lys Ile Asp Ala Glu Gly Ala Glu Ile Glu Ile Leu Asn  
 195 200 205

Gln Ile Tyr Glu Phe Thr Glu Lys His Asn Gly Ile Glu Tyr Tyr Ile  
 210 215 220

Cys Phe Glu Phe Ala Met Gly His Ile Gln Arg Ser Asn Arg Thr Phe  
 225 230 235 240

Asp Glu Ile Phe Asn Ile Ile Asn Ser Lys Phe Gly Ser Lys Ala Tyr  
 245 250 255

Phe Ile His Pro Leu Ser Ser Ala Glu His Pro Glu Phe Asn Lys Ala  
 260 265 270

Thr Gln Asp Ile Asn Gly Asn Ile Cys Phe Lys Tyr Val Ser  
 275 280 285

<210> 7  
 <211> 4858  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Plásmido de síntesis

<400> 7

```

aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatfff tctaaataca      60
ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatccggatt      120
gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg      180
cattttgcct tcctgtffff gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag      240
atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg      300
agagttttcg ccccgaagaa cgtttttcaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg      360
gcgcggtatt atcccgtggt gacgcggggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt      420
ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tctcagaaaa gcatcttacg gatggcatga      480
cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac      540
ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc      600
atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc      660
gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac      720
tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag      780
gaccacttct gcgctcggcc cttecggetg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg      840
gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta      900
    
```

ES 2 616 912 T3

tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg 960  
 ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata 1020  
 tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt 1080  
 ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactca gcgctcagacc 1140  
 ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct 1200  
 tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa 1260  
 ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag 1320  
 tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc 1380  
 tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcc a gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg 1440  
 actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg gggtcgtgca 1500  
 cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt 1560  
 gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg 1620  
 tcggaacagg acagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgctggtat ctttatagtc 1680  
 ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 1740  
 ggagcctatg gaaaatcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 1800  
 cctttgagtg agctgacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgcggc 1860  
 cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 1920  
 cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga 1980  
 gcgaggaagc ggaagagcgc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tcgggtat 2040  
 cacaccgat atggtgcaact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagt 2100  
 atacactccg ctatcgctac gtgactgggt catggtgctc cccgacacc cgccaacacc 2160  
 cgtgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac 2220  
 cgtctccggg agctgcatgt gtcagagggt ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgaggca 2280  
 ggatcccga cgcagcaag acgtagccca gcgcgtcggc cagcttgcaa ttcgcgctaa 2340  
 ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 2400  
 ctgcattaat gaatcgcca acgcgcggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgccagggt 2460  
 ggtttttctt ttcaccagtg agacgggcaa cagctgattg cccttcaacc cctggccctg 2520  
 agagagttgc agcaagcggc ccacgctggt ttgcccagc aggcgaaaat cctgtttgat 2580  
 ggtggttaac ggcgggatat aacatgagct gtcttcggta tcgtcgtatc ccactaccga 2640  
 gatatccgca ccaacgcgca gcccgactc ggtaatggcg cgcattgcgc ccagcgcct 2700  
 ctgatcggtg gcaaccagca tcgcagtggg aacgatgccc tcattcagca tttgcatggt 2760  
 ttgttgaaaa ccggacatgg cactccagtc gccttcccgt tccgctatcg gctgaatttg 2820  
 attgcgagtg agatatttat gccagccagc cagacgcaga cgcgccgaga cagaacttaa 2880

ES 2 616 912 T3

tgggcccgct aacagcgcga tttgctgggt acccaatgcg accagatgct ccacgcccag 2940  
 tcgcgtaccg tcttcatggg agaaaataat actgttgatg ggtgtctggg cagagacatc 3000  
 aagaaataac gccggaacat tagtgcaggc agcttccaca gcaatggcat cctggtcatc 3060  
 cagcggatag ttaatgatca gccactgac gcgttgcgcg agaagattgt gcaccgccgc 3120  
 tttacaggct tcgacgccgc ttcgttctac catcgacacc accacgctgg caccagttg 3180  
 atcggcgcga gatttaatcg ccgcgacaat ttgcgacggc gcgtgcaggg ccagactgga 3240  
 ggtggcaacg ccaatcagca acgactgttt gcccgccagt tgttgtgcca cgcggttggg 3300  
 aatgtaattc agctccgcc a tcgccgcttc cactttttcc cgcgttttcg cagaaacgtg 3360  
 gctggcctgg ttcaccacgc gggaaacggt ctgataagag acaccggcat actctgcgac 3420  
 atcgtataac gttactgggt tcacattcac caccctgaat tgactctctt ccgggcgcta 3480  
 tcatgccata ccgcgaaagg tttgaccca ttcgatgggtg tcaacgtaaa tgccgcttcg 3540  
 ccttcgcgcg cgaattgcaa gctgatccgg gcttatcgac tgcacgggtgc accaatgctt 3600  
 ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggtcgtaa atcactgcat 3660  
 aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt ctggataatg ttttttgcgc cgacatcata 3720  
 acggttctgg cagatctgaa atgagctgtt gacaattaat catcggctcg tataatgtgt 3780  
 ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaaacagaa ttcttgcac tgcaagttga 3840  
 ttctgtatgt tattttttac gctaataatta tttaaaattg aggtagtatg aaacatctaa 3900  
 taaaaaacta tgtacaaaaa ttaattaaaa cagagcttga tgctattcag tcaaagtctg 3960  
 ttcatgataa tcgaaacttc atttacaatg gagagttttt aattcttgaa agcgaatttg 4020  
 gatggcattg ttttccaga gtgcagttga accatgcttt aagctacaaa aacccaaact 4080  
 ttgatttagg tatgcgtcac tggattgtta atcattgtaa gcatgacacc acttatattg 4140  
 atatcgggtgc aaacgttgga actttctgtg gaatcgctgc tcgtcatatt acacaaggaa 4200  
 aaattatagc gatagaacca ctcacagaaa tggaaaatag tattaggatg aatggtcaat 4260  
 taaataatcc actagttgag tttcatcatt ttggctgtgc aatagggtgag aatgaagggg 4320  
 aaaatatttt cgaagtttat gagtttgata atagggtgtc atcattatat tttcaaaaaa 4380  
 atacagacat agcagataag gttaaaaata gccaaagtct ggtagaaaag ttaagtagtt 4440  
 tagatatatc gcctactaac tctgtagtta taaaattga tgctgaaggc gcagaaatag 4500  
 agatattaaa ccagatttac gaattcacag aaaagcataa tgggaattgaa tattatattt 4560  
 gctttgaatt tgcaatgggt catatacaga ggtctaatag aacttttgat gagattttta 4620  
 acataataaa ctcaaaattc ggaagtaagg catattttat tcatccatta tcatccgctg 4680  
 aacatcctga gtttaataaa gcaacgcagg atattaatgg gaatatctgt tttaaatatg 4740  
 tatcataaaa taatttaata tattctcgta tgtcattgca agttcaacag acatttccga 4800  
 agagttcact ataagcttag cccgcctaat gagcgggctt ttttttctcg aggacgtc 4858

ES 2 616 912 T3

```

<210> 8
<211> 28
<212> ADN
5 <213> Vibrio cholerae

<400> 8
gcgcgccaga acttgctat ttttaacc 28

10 <210> 9
<211> 104
<212> ADN
<213> Vibrio cholerae

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n indica a, t, c o g

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> b indica c o g o t

25 <400> 9
ggggggttcga agtttatgag tttgataata ggggtgnbtc attatatattt caaaaaaata 60
cagacatagc agataagggtt aaaaatagcc aagttctggc gcgc 104

<210> 10
<211> 934
30 <212> ADN
<213> Vibrio cholerae

<220>
<221> CDS
35 <222> (22)..(678)

<400> 10
attattttaa ttgaggtagt a atg aaa cat cta ata aaa aac tat gta caa 51
Met Lys His Leu Ile Lys Asn Tyr Val Gln
1 5 10

aaa tta att aaa aca gag ctt gat gct att cag tca aag tct gtt cat 99
Lys Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Ala Ile Gln Ser Lys Ser Val His
15 20 25

gat aat cga aac ttc att tac aat gga gag ttt tta att ctt gaa agc 147
Asp Asn Arg Asn Phe Ile Tyr Asn Gly Glu Phe Leu Ile Leu Glu Ser
30 35 40

gaa ttt gga ttg cat tgt ttt ccc aga gtg cag ttg aac cat gct tta 195
Glu Phe Gly Leu His Cys Phe Pro Arg Val Gln Leu Asn His Ala Leu
45 50 55

agc tac aaa aac cca aac ttt gat tta ggt atg cgt cac tgg att gtt 243
Ser Tyr Lys Asn Pro Asn Phe Asp Leu Gly Met Arg His Trp Ile Val
60 65 70

```

ES 2 616 912 T3

aat cat tgt aag cat gac acc act tat att gat atc ggt gca aac gtt 291  
 Asn His Cys Lys His Asp Thr Thr Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Asn Val  
 75 80 85 90  
  
 gga act ttc tgt gga atc gct gct cgt cat ata cac caa gga aaa att 339  
 Gly Thr Phe Cys Gly Ile Ala Ala Arg His Ile His Gln Gly Lys Ile  
 95 100 105  
  
 ata gcg ata gaa cca ctc aca gaa atg gaa aat agt att agg atg aat 387  
 Ile Ala Ile Glu Pro Leu Thr Glu Met Glu Asn Ser Ile Arg Met Asn  
 110 115 120  
  
 gtt caa tta aat aat cca cta gtt gag ttt cat cat ttt ggc tgt gca 435  
 Val Gln Leu Asn Asn Pro Leu Val Glu Phe His His Phe Gly Cys Ala  
 125 130 135  
  
 ata ggt gag aat gaa ggg gaa aat att ttc gaa gtt tat gag ttt gat 483  
 Ile Gly Glu Asn Glu Gly Glu Asn Ile Phe Glu Val Tyr Glu Phe Asp  
 140 145 150  
  
 aat agg gtg tca tca tta tat ttt aaa aaa aat aca gac ata gca gat 531  
 Asn Arg Val Ser Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Asn Thr Asp Ile Ala Asp  
 155 160 165 170  
  
 aag gtt aaa aat agc caa gtt ctg gtt aga aag tta agt agt tta gat 579  
 Lys Val Lys Asn Ser Gln Val Leu Val Arg Lys Leu Ser Ser Leu Asp  
 175 180 185  
  
 ata tcg cct act aac tct gta gtt ata aaa att gat gct gaa ggc gca 627  
 Ile Ser Pro Thr Asn Ser Val Val Ile Lys Ile Asp Ala Glu Gly Ala  
 190 195 200  
  
 gaa ata gag ata tta aac cag att tac gaa ttc aca gaa aag cat aat 675  
 Glu Ile Glu Ile Leu Asn Gln Ile Tyr Glu Phe Thr Glu Lys His Asn  
 205 210 215  
  
 tga attgaatatt atatttgctt tgaatttgca atgggtcata tacagaggtc 728  
  
 taatagaact ttgatgaga tttttaacat aataaactca aaattcggaa gtaaggcata 788  
  
 ttttattcat ccattatcat ccgctgaaca tcctgagttt aataaagcaa cgcaggatat 848  
  
 taatgggaat atctgtttta aatatgtatc ataaaataat ttaatatatt ccgtatgtca 908  
  
 ttgcaagttc aacagacatt tcgaga 934

<210> 11  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> *Vibrio cholerae*

5

<400> 11  
 Met Lys His Leu Ile Lys Asn Tyr Val Gln Lys Leu Ile Lys Thr Glu  
 1 5 10 15  
  
 Leu Asp Ala Ile Gln Ser Lys Ser Val His Asp Asn Arg Asn Phe Ile  
 20 25 30  
  
 Tyr Asn Gly Glu Phe Leu Ile Leu Glu Ser Glu Phe Gly Leu His Cys  
 35 40 45

ES 2 616 912 T3

Phe Pro Arg Val Gln Leu Asn His Ala Leu Ser Tyr Lys Asn Pro Asn  
 50 55 60

Phe Asp Leu Gly Met Arg His Trp Ile Val Asn His Cys Lys His Asp  
 65 70 75 80

Thr Thr Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Asn Val Gly Thr Phe Cys Gly Ile  
 85 90 95

Ala Ala Arg His Ile His Gln Gly Lys Ile Ile Ala Ile Glu Pro Leu  
 100 105 110

Thr Glu Met Glu Asn Ser Ile Arg Met Asn Val Gln Leu Asn Asn Pro  
 115 120 125

Leu Val Glu Phe His His Phe Gly Cys Ala Ile Gly Glu Asn Glu Gly  
 130 135 140

Glu Asn Ile Phe Glu Val Tyr Glu Phe Asp Asn Arg Val Ser Ser Leu  
 145 150 155 160

Tyr Phe Lys Lys Asn Thr Asp Ile Ala Asp Lys Val Lys Asn Ser Gln  
 165 170 175

Val Leu Val Arg Lys Leu Ser Ser Leu Asp Ile Ser Pro Thr Asn Ser  
 180 185 190

Val Val Ile Lys Ile Asp Ala Glu Gly Ala Glu Ile Glu Ile Leu Asn  
 195 200 205

Gln Ile Tyr Glu Phe Thr Glu Lys His Asn  
 210 215

<210> 12  
 <211> 1954  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido de síntesis

10

<400> 12

# ES 2 616 912 T3

|             |            |            |            |            |            |     |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| agtaatacga  | ctcactagtg | ggcagatcct | cgaatgcac  | gcgcgcaccg | tacgtctcga | 60  |
| ggaattcctg  | caggatatct | ggatccacga | agcttcccat | ggtgacgtca | ccggttctag | 120 |
| atacctaggt  | gagctctggt | accctctagt | caaggcctgt | cagccgtaa  | gtgttcctgt | 180 |
| gtcactgaaa  | attgctttga | gaggctctaa | gggcttctca | gtgcgttaca | tcctggctt  | 240 |
| gttgtccaca  | accgttaaac | cttaaaagct | ttaaaagcct | tatatattct | ttttttctt  | 300 |
| ataaaaactta | aaaccttaga | ggctatttaa | gttgctgatt | tatattaatt | ttattgttca | 360 |

ES 2 616 912 T3

aacatgagag cttagtagct gaaacatgag agcttagtagt gttagccatg agagcttagt 420  
 acgtagacca tgagggttta gttcgttaaa catgagagct tagtagctta aacatgagag 480  
 cttagtagct gaaacatgag agcttagtagt gtactatcaa cagggtgaac tgctgatctt 540  
 cagatctccg cttgccctca tctgttacgc cggcggtagc cggccagcct cgagagcag 600  
 gattcccgtt gagcaccgcc aggtgcgaat aaggacagc gaagaaggaa caccgctcg 660  
 cgggtgggccc tacttcacct atcctgccc gctgacgcc ttggatacac caaggaaagt 720  
 ctacacgaac ctttggcaa aatcctgtat atcgtgcgaa aaaggatgga tataccgaaa 780  
 aatcgctat aatgaccccg aagcagggtt atgcagcggg aaagcgtgc ttcctgctg 840  
 tttgtggaa tatctaccga ctggaaacag gcaaatgcag gaaattactg aactgagggg 900  
 acaggcgaga gatctggcct aggcgcaccg aataaatacc tgtgacggaa gatcacttcg 960  
 cagaataaat aatcctggt gtccctggtg ataccgggaa gccctgggccc aacttttggc 1020  
 gaaaatgaga cgtagatcgg cacgtaagag gttccaactt tcaccataat gaaataagat 1080  
 cactaccggg cgtatTTTTT gagttgtcga gattttcagg agctaaggaa gctaaaatgg 1140  
 agaaaaaat cactggatat accaccggtg atatatccca atggcatcgt aaagaacatt 1200  
 ttgaggcatt tcagtcagtt gctcaatgta cctataacca gaccgttcag ctggatatta 1260  
 cggcctTTTT aaagaccgta aagaaaaata agcacaagtt ttatccggcc tttattcaca 1320  
 ttcttgcccg cctgatgaat gctcatccgg aattacgtat ggcaatgaaa gacggtgagc 1380  
 tggtagatag ggatagtgtt cacccttggt acaccgtttt ccatgagcaa actgaaacgt 1440  
 tttcatcgtc ctggagtgaa taccacgacg atttccggca gtttctacac atatattcgc 1500  
 aagatgtggc gtgttacggt gaaaacctgg cctatttccc taaagggttt attgagaata 1560  
 tgTTTTTcgt ctgagccaat ccctgggtga gtttcaccag ttttgattta aacgtggcca 1620  
 atatggaaa cttcttcgcc cccgttttca ccatgggcaa atattatagc caaggcgaca 1680  
 aggtgctgat gccgctggcg attcagggtc atcatgccgt ttgtgatggc ttccatgctg 1740  
 gcagaatgct taatgaatta caacagtact gcgatgagtg gcagggcggg gcgtaatttt 1800  
 ttaaggcag ttattggtgc ccataaacgc ctggttgcta cgctgaata agtgataata 1860  
 agcggatgaa tggcagaaat tcgaaagcaa attcgaccgc gtcgtcgggt cagggcaggg 1920  
 tcgttaaata gccgcttatg tctattgctg gttt 1954

<210> 13  
 <211> 2948  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Constructo de vector de síntesis con inserto de *wbeT* de tipo natural

10



## ES 2 616 912 T3

<220>

<221> misc\_feature

<222> (151)..(1011)

<223> Inserto de CDS de tipo natural de *wbeT* en orientación inversa

5

<400> 13

ES 2 616 912 T3

agtaatacga ctactagtg ggcagatctt cgaatgcac gcgcgcaccg tacgtctcga 60  
 ggaattcctg caggatatct ggatctatag tgaactcttc ggaaatgtct gttgaacttg 120  
 caatgacata cgagaatata ttaaattatt ttatgataca tatttaaac agatattccc 180  
 attaatatcc tgcgttgctt tattaaactc aggatgttca gcggatgata atggatgaat 240  
 aaaatatgcc ttacttccga attttgagtt tattatgtta aaaatctcat caaaagttct 300  
 attagacctc tgtatatgac ccattgcaaa ttcaaagcaa atataatatt caattccatt 360  
 atgcttttct gtgaattcgt aaatctgggt taatatctct atttctgcgc cttcagcatc 420  
 aatttttata actacagagt tagtaggcca tataatctaa ctacttaact ttctaaccag 480  
 aacttggtca tttttaacct tatctgctat gtctgtattt ttttgaaaat ataatgatga 540  
 caccctatta tcaaactcat aaacttcgaa aatattttcc cttcattct cacctattgc 600  
 acagccaaaa tgatgaaact caactagtgg attatttaat tgaacattca tcctaatact 660  
 attttccatt tctgtgagtg gttctatcgc tataattttt cttgtgttaa tatgacgagc 720  
 agcgattcca cagaaagttc caacgtttgc accgatatca atataagtgg tgcatgctt 780  
 acaatgatta acaatccagt gacgcatacc taaatcaaag tttgggtttt tgtagcttaa 840  
 agcatggttc aactgcactc tgggaaaaca atgccatcca aattcgcttt caagaattaa 900  
 aaactctcca ttgtaaatga agtttcgatt atcatgaaca gactttgact gaatagcatc 960  
 aagctctggt ttaattaatt tttgtacata gttttttatt agatgtttca tactacctca 1020  
 attttaata atattagcgt aaaaaataac atacagaatc aacttgcaga tgacagatc 1080  
 cacgaagctt cccatggtga cgtcaccggt tctagatacc taggtgagct ctggtaccct 1140  
 ctagtcaagg cctgtcagcc gtttaagtgtt cctgtgtcac tgaaaattgc tttgagaggc 1200  
 tctaagggct tctcagtgcg ttacatccct ggcttggtgt ccacaaccgt taaaccttaa 1260  
 aagctttaa agccttatat attctttttt ttcttataaa acttaaaacc ttagaggcta 1320  
 ttttaagttgc tgatttatat taattttatt gttcaaacat gagagcttag tacgtgaaac 1380  
 atgagagctt agtacgtag ccatgagagc ttagtacggt agccatgagg gtttagttcg 1440  
 ttaaacadga gagcttagta cgttaaacad gagagcttag tacgtgaaac atgagagctt 1500  
 agtacgtact atcaacaggt tgaactgctg atcttcagat ctccgcttgc cctcatctgt 1560  
 tacgccggcg gtagccggcc agcctcgcag agcaggattc ccggtgagca ccgccaggtg 1620  
 cgaataaggg acagtgaaga aggaacaccc gctcgcgggt gggcctactt cacctatcct 1680  
 gcccggtga cgcggttggg tacaccaagg aaagtctaca cgaacccttt ggcaaaatcc 1740  
 tgtatatcgt gcgaaaaagg atggatatac cgaaaaaatc gctataatga ccccgagca 1800

ES 2 616 912 T3

gggttatgca gcggaaaagc gctgcttccc tgctgttttg tggaatatct accgactgga 1860  
 aacaggcaaa tgcaggaaat tactgaactg aggggacagg cgagagatct ggcctaggcc 1920  
 gaccgaataa atacctgtga cggaagatca ctctgcagaa taaataaatc ctggtgtccc 1980  
 tgttgatacc ggggaagccct gggccaactt ttggcgaaaa tgagacgttg atcggcacgt 2040  
 aagaggttcc aactttcacc ataatgaaat aagatcacta cggggcgtat tttttgagtt 2100  
 gtcgagattt tcaggagcta aggaagctaa aatggagaaa aaaatcactg gatataccac 2160  
 cgttgatata tcccaatggc atcgtaaaga acattttgag gcatttcagt cagttgctca 2220  
 atgtacctat aaccagaccg ttcagctgga tattacggcc tttttaaaga ccgtaaagaa 2280  
 aaataagcac aagttttatc cggcctttat tcacattctt gcccgcctga tgaatgctca 2340  
 tccggaatta cgtatggcaa tgaaagacgg tgagctggtg atatgggata gtgttcaccc 2400  
 ttgttacacc gttttccatg agcaaaactga aacgttttca tcgctctgga gtgaatacca 2460  
 cgacgatttc cggcagtttc tacacatata ttcgcaagat gtggcgtgtt acggtgaaaa 2520  
 cctggcctat ttccctaaag ggtttattga gaatatgttt ttcgtctcag ccaatccctg 2580  
 ggtgagtttc accagttttg atttaaacgt ggccaatatg gacaacttct tcgccccgtt 2640  
 ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc gacaagggtc tgatgccgct ggcgattcag 2700  
 gttcatcatg ccgtttgtga tggettccat gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag 2760  
 tactgcatg agtggcaggg cggggcgtaa tttttttaag gcagttattg gtgccataa 2820  
 acgcctgggt gctacgcctg aataagtgat aataagcgga tgaatggcag aaattcgaaa 2880  
 gcaaattcga cccggtcgtc ggttcagggc agggtcgtta aatagccgct tatgtctatt 2940  
 gctggttt 2948

5 <210> 14  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Vibrio cholerae*

10 <400> 14  
 cggtgcaaac gttggaactt tctg 24

15 <210> 15  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> *Vibrio cholerae*

<400> 15  
 ggaaaacaat gccatccaaa ttcgc 25

20 <210> 16  
 <211> 3694  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Constructo de síntesis

ES 2 616 912 T3

<400> 16

|             |             |             |             |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| ttcgatattt  | tttagttcct  | taggcccgta  | gtctgcaaat  | ccttttatga | ttttctatca  | 60   |
| aacaaaagag  | gaaaatagac  | cagttgcaat  | ccaaacgaga  | gtctaataga | atgagggtcga | 120  |
| aaagtaaatac | gcgcggggtt  | gttactgata  | aagcaggcaa  | gacctaaaat | gtgtaaaggg  | 180  |
| caaagtgtat  | actttggcgt  | caccoccttac | atatttttagg | tcttttttta | ttgtgcgtaa  | 240  |
| ctaacttgcc  | atcttcaaac  | aggagggtctg | gaagaagcag  | accgctaaca | cagtacataa  | 300  |
| aaaaggagac  | atgaacgatg  | aacatcaaaa  | agtttgcaaa  | acaagcaaca | gtattaacct  | 360  |
| ttactaccgc  | actgctggca  | ggaggcgcaa  | ctcaagcggt  | tgcgaaagaa | acgaacccaaa | 420  |
| agccatataa  | ggaaacatac  | ggcatttccc  | atattacacg  | ccatgatatg | ctgcaaatcc  | 480  |
| ctgaacagca  | aaaaaatgaa  | aaatatcaag  | ttcctgaatt  | cgattcgtcc | acaattaaaa  | 540  |
| atatctcttc  | tgcaaaaaggc | ctggacggtt  | gggacagctg  | gccattacaa | aacgctgacg  | 600  |
| gcactgtcgc  | aaactatcac  | ggctaccaca  | tcgtctttgc  | attagccgga | gatcctaaaa  | 660  |
| atgctggatga | cacatcgatt  | tacatgttct  | atcaaaaagt  | cggcgaaact | tctattgaca  | 720  |
| gctggaaaaa  | cgctggccgc  | gtctttaaag  | acagcgacaa  | attcgatgca | aatgattcta  | 780  |
| tcctaaaaga  | ccaaacacaa  | gaatggtcag  | gttcagccac  | atttacatct | gacggaaaaa  | 840  |
| tccgtttatt  | ctacactgat  | ttctccggta  | aacattacgg  | caaacaaaca | ctgacaactg  | 900  |
| cacaagttaa  | cgtatcagca  | tcagacagct  | ctttgaacat  | caacggtgta | gaggattata  | 960  |
| aatcaatctt  | tgacgggtgac | ggaaaaacgt  | atcaaaaatgt | acagcagttc | atcgatgaag  | 1020 |
| gcaactacag  | ctcaggcgac  | aaccatacgc  | tgagagatcc  | tcactacgta | gaagataaag  | 1080 |
| gccacaaata  | cttagtattt  | gaagcaaaca  | ctggaactga  | agatggctac | caaggcgaag  | 1140 |
| aatctttatt  | taacaaagca  | tactatggca  | aaagcacatc  | attcttccgt | caagaaagtc  | 1200 |
| aaaaacttct  | gcaaagcgat  | aaaaaacgca  | cggctgagtt  | agcaaacggc | gctctcggta  | 1260 |
| tgattgagct  | aaacgatgat  | tacacactga  | aaaaagtgat  | gaaaccgctg | attgcatcta  | 1320 |
| acacagtaac  | agatgaaatt  | gaacgcgcga  | acgtctttaa  | aatgaacggc | aaatggtacc  | 1380 |
| tgttcactga  | ctcccgcgga  | tcaaaaatga  | cgattgacgg  | cattacgtct | aacgatattt  | 1440 |
| acatgcttgg  | ttatgtttct  | aattctttaa  | ctggcccata  | caagccgctg | aacaaaactg  | 1500 |
| gccttgtggt  | aaaaatggat  | cttgatccta  | acgatgtaac  | ctttacttac | tcacacttcg  | 1560 |
| ctgtacctca  | agcgaaagga  | aacaatgtcg  | tgattacaag  | ctatatgaca | aacagaggat  | 1620 |
| tctacgcaga  | caaacaatca  | acgtttgcgc  | caagcttcct  | gctgaacatc | aaaggcaaga  | 1680 |
| aaacatctgt  | tgtcaaagac  | agcatccttg  | aacaaggaca  | attaacagtt | aacaaataaa  | 1740 |
| aacgcaaaaag | aaaatgccga  | ttgaggccag  | tttgctcagg  | ctctccccgt | ggaggtaata  | 1800 |
| attgacgata  | tgatcagtaa  | tacgactcac  | tagtgggcag  | atcttcgaat | gcatcgcgcg  | 1860 |

ES 2 616 912 T3

caccgtacgt ctcgaggaat tcctgcagga tatctggatc cacgaagctt cccatggtga 1920  
 cgtcaccggt tctagatacc taggtgagct ctggtaccct ctagtcaagg cctgtcagcc 1980  
 gttaagtgtt cctgtgtcac tgaaaattgc tttgagaggc tctaagggct tctcagtgcg 2040  
 ttacatccct ggcttgttgt ccacaaccgt taaacctta aagctttaa agccttatat 2100  
 attctttttt ttcttataaa acttaaaacc ttagaggcta ttttaagttgc tgatttatat 2160  
 taatthttatt gttcaaacat gagagcttag tacgtgaaac atgagagctt agtacgttag 2220  
 ccatgagagc ttagtacggt agccatgagg gtttagttcg ttaaacaatga gagcttagta 2280  
 cgttaaacaat gagagcttag tacgtgaaac atgagagctt agtacgtact atcaacaggt 2340  
 tgaactgctg atcttcagat ctccgcttgc cctcatctgt tacgccggcg gtagccggcc 2400  
 agcctcgcag agcaggattc ccggtgagca ccgccagggt cgaataaggg acagtgaaga 2460  
 aggaacaccc gctcgcgggt gggcctactt cacctatcct gcccggtga gcccggtgga 2520  
 tacaccaagg aaagtctaca cgaacccttt ggcaaatcc tgtatatcgt gcgaaaaagg 2580  
 atggatatac cgaaaaaatc gctataatga ccccgaagca gggttatgca gcggaaaagc 2640  
 gctgcttccc tgctgttttg tggaatatct accgactgga aacaggcaaa tgcaggaaat 2700  
 tactgaactg aggggacagg cgagagatct ggcctaggcc gaccgaataa atacctgtga 2760  
 cggaagatca ctctgcagaa taaataaatc ctggtgtccc tgttgatacc gggaaagcct 2820  
 gggccaactt ttggcgaaaa tgagacggtg atcggcacgt aagaggttcc aactttcacc 2880  
 ataataaat aagatcacta ccgggcggtat tttttgagtt gtcgagattt tcaggagcta 2940  
 aggaagctaa aatggagaaa aaaatcactg gatataccac cgttgatata tcccaatggc 3000  
 atcgtaaaga acatthtgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg 3060  
 ttcagctgga tattacggcc tttttaaaga ccgtaaagaa aaataagcac aagthttatc 3120  
 cggcctttat tcacattctt gccgcctga tgaatgctca tccggaatta cgtatggcaa 3180  
 tgaaagacgg tgagctggtg atatgggata gtgttcaccc ttgttacacc gthttccatg 3240  
 agcaaacatga aacgthttca tcgctctgga gtgaatacca cgacgatttc cggcagthtc 3300  
 tacacatata ttcgcaagat gtggcgtggt acggtgaaaa cctggcctat thccctaaag 3360  
 ggtthattga gaatatgtht ttcgctctcag ccaatccctg ggtgagthtc accagthttg 3420  
 atthaaacgt ggccaatatg gacaacttct tcgccccgt thtcacatg ggcaaatatt 3480  
 atacgcaagg cgacaaggtg ctgatgccgc tggcgattca ggttcatcat gccgthttgtg 3540  
 atggctthca tgcgcgcaga atgctthaat aattacaaca gtactgcgat gagtggcagg 3600  
 gcggggcgta atthththaa ggcagthatt ggtgcccata aacgcctggt tgctacgcct 3660  
 gaataagtgat taataagcgg atgaatggca gaaa 3694

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Vacuna que comprende una célula de *Vibrio cholerae* O1, caracterizada porque dicha célula comprende antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba, en la que la vacuna comprende múltiples células de *Vibrio cholerae* que comprenden antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba, y en la que, en promedio, el 10-90% de los antígenos O1 de las células son del serotipo Ogawa.
- 10 2. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, con la condición de que dicha vacuna no contenga ninguna célula completa inmunológicamente activa adicional además de células de *Vibrio cholerae* O1 que comprenden antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba.
- 15 3. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vacuna es para administración oral.
- 20 4. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula está inactivada con formalina.
- 25 5. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha célula es tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-11.
- 30 6. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en inmunización preventiva.
- 35 7. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en inmunización preventiva contra el cólera.
- 40 8. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula comprende además una o más proteínas de factor de colonización (CF) de ETEC, tales como CFA/I, CS2 o CS5, en la que dicha(s) proteína(s) de CF se expresa(n) o bien como fimbrias únicas, dobles o bien híbridas.
- 45 9. Vacuna según la reivindicación 8, para su uso en inmunización preventiva contra infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).
- 50 10. Célula de *Vibrio cholerae* O1 que expresa simultáneamente antígenos tanto Inaba como Ogawa caracterizada porque
  - a. la célula comprende un gen *wbeT* endógeno; y
  - b. la célula comprende un constructo de ADN recombinante que puede modular el nivel de expresión de gen *wbeT* endógeno o la actividad enzimática del producto del mismo;
 

40 en la que dicho constructo está adaptado para modificar el gen *wbeT* endógeno del huésped por medio de recombinación homóloga y en la que
  - c. el nivel modulado de la actividad enzimática de *WbeT* es tal que la célula expresa simultáneamente antígenos Inaba y Ogawa, en la que el 10-90% del antígeno O1 expresado por la célula es del serotipo Ogawa.
- 55 11. Célula de *Vibrio cholerae* O1 según la reivindicación 10, en la que la célula expresa además una o más proteínas de factor de colonización (CF) de ETEC, tales como CFA/I, CS2 o CS5, en la que dicha(s) proteína(s) de CF se expresa(n) o bien como fimbrias únicas, dobles o bien híbridas.
- 60 12. Método para fabricar una vacuna, que comprende las etapas de:
  - a. proporcionar una célula de *Vibrio cholerae* O1 que comprende antígenos O1 de los serotipos tanto Ogawa como Inaba; y
  - b. inactivar dicha célula.
- 65 13. Método según la reivindicación 12, en el que la inactivación se realiza mediante tratamiento con formalina.
- 70 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-13 en el que la célula es una célula según cualquiera de las reivindicaciones 10-11.