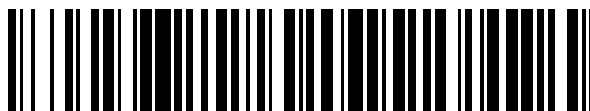


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 120**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/108** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2014 PCT/IB2014/061731**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191903**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2014 E 14736442 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3003348**

54 Título: **Quimeras de lumazina sintasa de Brucella y subunidad beta de toxinas AB5**

30 Prioridad:

**27.05.2013 US 201361827713 P**

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

**19.03.2020**

73 Titular/es:

**INMUOVA S.A. (50.0%)  
25 de mayo 574 Piso 2 Of. 12  
1642 San Isidro - Pcia. de Buenos Aires, AR y  
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS Y TECNICAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SPATZ, MARTÍN, DIEGO, LINUS;  
GOLDBAUM, FERNANDO, ALBERTO;  
ZYLBERMAN, VANESA;  
CRAIG, PATRICIO, OLIVER;  
GHERSI, GISELLE;  
PALERMO, MARINA, SANDRA;  
MEJIAS, MARIA, PILAR y  
BENTANCOR, LETICIA, VERONICA**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 749 120 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

Quimeras de lumazina sintasa de *Brucella* y subunidad beta de toxinas AB<sub>5</sub>

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a polipéptidos quiméricos útiles como inmunógenos para inducir respuestas inmunitarias protectoras y anticuerpos neutralizantes contra la toxina Shiga (Stx, *Shiga toxin*) en mamíferos. Más específicamente, la presente invención se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden un monómero de subunidad B homopentamérica de la toxina Shiga 2 fusionado al extremo N-terminal de un monómero de lumazina sintasa de *Brucella* y complejos proteicos oligoméricos formados a partir de dichos polipéptidos quiméricos. La invención se refiere además a polinucleótidos y vectores que codifican para dichos polipéptidos quiméricos, a células transgénicas que comprenden dichos polinucleótidos y vectores, y a composiciones farmacéuticas, tales como una vacuna, que comprenden dichos polipéptidos quiméricos y polinucleótidos quiméricos. También está dentro del alcance de la invención un método para obtener anticuerpos que se unen específicamente a la subunidad B de la toxina Shiga 2 y métodos para reducir la carga bacteriana de *Escherichia coli* enterohemorrágica en mamíferos, que pueden usarse para la prevención de, entre otros, síndrome ureico hemolítico (SUH).

20 **Antecedentes de la técnica**

Las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) son importantes patógenos humanos transmitidos por los alimentos (Kaper *et al.*, 2004. Nat Rev Microbiol 2:123-140). Las manifestaciones clínicas de las infecciones por ECEH oscilan desde diarrea acuosa o colitis hemorrágica (CH), hasta el desenlace más grave, el síndrome urémico hemolítico (SUH) potencialmente mortal (Karmali 1989. Clin Microbiol Rev 2:15-38). La infección se correlaciona con la ingestión de carne o verduras contaminadas, pero también se transmite por el agua o incluso por contacto de una persona a otra (Caprioli *et al.*, 2005. Vet Res 36:289-311; Griffin y Tauxe, 1991. Epidemiol Rev 13:60-98). Se han notificado brotes esporádicos o masivos en varios países desarrollados. En otros países, como en Argentina, el SUH muestra un comportamiento endémico y representa un grave problema de salud pública con altos valores de morbimortalidad (Lopez *et al.*, 2000. Infect Dis Clin North Am 14:41-65, viii; Rivas *et al.*, 2006. Medicina (B Aires) 66 Supl. 3:27-32).

Una característica sorprendente de la infección por ECEH es la producción de potentes toxinas Shiga, responsables del desarrollo del SUH (Noel y Boedeker, 1997. Dig Dis 15:67-91; O'Brien *et al.*, Curr Top Microbiol Immunol 180:65-94). La familia de toxinas Shiga es un grupo de exotoxinas AB<sub>5</sub> estructural y funcionalmente relacionadas, que incluye la toxina Shiga (Stx) producida por *Shigella dysenteriae* serotipo 1 y las toxinas Shiga producidas por cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). La ECEH puede producir dos tipos de Stx, la toxina Shiga tipo 1 (Stx1) y tipo 2 (Stx2), y sus variantes alélicas. Los genes para las toxinas Shiga están codificados por bacteriófagos lamboides lisógenos (Schmidt, 2001. Res Microbiol 152 (8): 687-95), y una bacteria dada puede expresar más de una Stx, ya que pueden contener más de un bacteriófago que codifica para Stx.

Todos los miembros de la familia de toxinas Shiga tienen una configuración molecular AB<sub>5</sub> (Stein *et al.*, 1992. Nature 355 (6362): 748-50; Fraser *et al.*, 1994. Nat Struct Biol 1 (1): 59-64), en la que una subunidad A monomérica enzimáticamente activa, StxA (que tiene una masa molecular de 32 kDa) está asociada de manera no covalente con una subunidad B, StxB, responsable de la unión a receptores de la superficie celular. StxB es una proteína homopentamérica (un pentámero de monómeros idénticos, cada uno con una masa molecular de 7,7 kDa). StxB forma una estructura en forma de anillo con un poro central en la que se inserta el extremo carboxilo-terminal de StxA (Fraser *et al.*, 1994. Nat Struct Biol 1 (1): 59-64). Las subunidades StxA y StxB se secretan en el periplasma bacteriano, donde se ensamblan de manera no covalente para dar la holotoxina, tal como se describió inicialmente para las enterotoxinas termolábiles de *E. coli* (Hirst *et al.*, 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81 (24): 7752-6).

StxA presenta una actividad ARN *N*-glucosidasa altamente específica que escinde una base de adenina en la posición 4.324 en el bucle de  $\alpha$ -sarcina ubicado en el dominio VI del ARN ribosómico (ARNr) 28S de los ribosomas eucariotas, inhibiendo de ese modo la unión de aminoacil-ARNt dependiente de factor de elongación y la posterior elongación de cadena  $\downarrow$  (Endo *et al.*, 1988. Eur J Biochem 171 (1-2): 45-50). Los ribosomas bacterianos también son un sustrato para StxA, y la exposición a la toxina Shiga tipo 1 (Stx1) da como resultado una disminución de la proliferación de bacterias susceptibles (Suh *et al.*, 1998. Biochemistry 37 (26): 9394-8).

La subunidad StxA se compone de dos fragmentos unidos por un puente disulfuro, que se escinde proteolíticamente por enzimas en el citosol y el retículo endoplasmático, generando la subunidad A1 de 27 kDa responsable de la actividad enzimática y liberando el fragmento A2 más pequeño (Garred *et al.*, 1995. J Biol Chem 270 (18): 10817-21). Austin y sus colaboradores demostraron que mientras StxA y StxB pueden formar la holotoxina espontáneamente *in vitro* el fragmento A1 recombinante no puede unirse a StxB, lo que indica que el fragmento A2 es esencial para el ensamblaje de la holotoxina (Austin *et al.*, 1994. Infect Immun 62 (5): 1768-75).

Mientras que StxA es responsable del efecto tóxico, el pentámero StxB es responsable de la unión a un receptor específico en células eucariotas. StxB se une al glucoesfingolípido neutro globotriaosilceramida (Gb3; también

conocida como Cd77 o el antígeno de grupo sanguíneo Pk), que está presente en la superficie de las células (Jacewicz *et al.*, 1986. *J Exp Med* 163 (6): 1391-404; Lindberg *et al.*, 1987. *J Biol Chem* 262 (4): 1779-85; Waddell *et al.*, 1990. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (20): 7898-901), lo que conduce a la posterior internalización de la toxina. En ausencia de StxA, StxB todavía adopta una estructura pentamérica que es funcionalmente equivalente a la holotoxina en su capacidad para unirse al receptor (Donohue-Rolfe *et al.*, 1989. *Mol Microbiol* 3 (9): 1231-6). Cada monómero de subunidad B comprende dos láminas  $\beta$  antiparalelas tricaténarias y una hélice  $\alpha$ . El pentámero forma una estructura en forma de anillo con un poro central de aproximadamente 11 Å de diámetro delimitado por cinco hélices  $\alpha$  y rodeado por láminas  $\beta$  a partir de pares de monómeros adyacentes, formando láminas  $\beta$  antiparalelas hexacatenarias (Stein *et al.*, 1992. *Nature* 355 (6362): 748-50).

La resolución de la estructura cristalina de la subunidad B de la toxina Shiga 1 (Stx1B) complejada con un análogo de trisacárido Gb3 receptor reveló tres sitios de unión potenciales dentro de cada monómero de subunidad B (denominados sitios 1, 2 y 3) (Ling *et al.*, 1998. *Biochemistry* 37 (7): 1777-88). Por tanto, hay 15 sitios de unión a Gb3 en el pentámero StxB. Los 15 sitios de unión a Gb3 están orientados en la misma dirección, de manera distal a la subunidad A, identificando de ese modo la superficie de interacción de membrana dentro del pentámero. Los sitios de unión a Gb3 no interactúan entre sí ni directamente ni a través de cambios conformacionales.

El sitio 1 está ubicado en un surco entre subunidades B adyacentes y se caracteriza por una interacción hidrófoba entre el anillo de fenilo de Phe-30 y la Gal $\beta$  del receptor y por enlaces de hidrógeno que implican a Asp-17, Thr-21, Glu-28 y Gly-60. El sitio 2 está ubicado en el lado opuesto del anillo de fenilo de Phe-30 en una hendidura definida por Gly-63, Asn-32, Arg-33 y Ala-56. El tercer sitio de unión implica interacciones de apilamiento hidrófobas de Gal $\beta$  contra el anillo de indol de Trp-34 (ubicado en las hélices  $\alpha$  que rodean el poro central de Stx1B) y una interacción hidrófoba entre Gala y Trp-34 del monómero adyacente. Además, el hidrógeno de Gal $\alpha$  se une a Trp34 y Asn35, así como a Asp18 de un monómero adyacente. A partir de estos resultados, puede concluirse que al menos los sitios 1 y 3 requieren el ensamblaje correcto del pentámero para ser funcionales. Los estudios de mutaciones con Stx1B demostraron que los sitios 1 y 2 median en interacciones de alta afinidad y que la actividad citotóxica de Stx1 está mediada principalmente por la unión de Gb3 a los sitios 1 y 2. Sin embargo, el sitio 3 media en interacciones de baja afinidad (Bast *et al.*, 1999. *Mol Microbiol* 32 (5): 953-60). Aunque la afinidad del sitio 3 puede ser demasiado baja como para contribuir significativamente a la fuerza de la unión celular, Ling y sus colaboradores propusieron que podría servir con otros propósitos. Un motivo para esta creencia es el hecho de que el residuo de triptófano en la posición 34 se conserva a pesar de estar completamente expuesto al disolvente. Estos autores propusieron que el sitio 3 puede desempeñar un papel ayudando a secuestrar un mayor número de moléculas de Gb3 en la membrana por debajo de la toxina (Ling *et al.*, 2000. *Structure* 8 (3): 253-64). Por tanto, los tres sitios de unión a oligosacáridos son necesarios para la actividad biológica completa.

El estudio de Stx2B se ha visto obstaculizado debido a la dificultad de expresar grandes cantidades de la forma biológicamente activa (Acheson *et al.*, 1995. *Infect Immun* 63 (1): 301-8). Sin embargo, el análisis de la estructura cristalográfica de Stx2 predijo la presencia de los sitios de unión a trisacáridos correspondientes en su subunidad B, pero también demostró que la conformación en el sitio 2 difiere de manera distintiva de la de la toxina Shiga de *Shigella* y las subunidades B de Stx1 (Fraser *et al.*, 2004. *J Biol Chem* 279 (26): 27511-7). Sin embargo, los residuos implicados en la unión a azúcar o bien se conservan en la familia de toxinas Shiga o bien se sustituyen de manera conservativa (Ling *et al.*, 2000 *Structure* 8 (3): 253-64). Una excepción es la sustitución de Glu16 en el sitio 2 de Stx2B por ácido aspártico en Stx1B, donde el enlace de hidrógeno mediado por agua observado para Glu16 se reemplaza por una interacción directa para Asp16. Esta sustitución podría ser responsable, en parte, de la afinidad reducida por Gb3 de la toxina Shiga 2 y sus variantes.

La mutagénesis dirigida al sitio ha demostrado que el residuo conservado Gly60 es esencial para la citotoxicidad de Stx1 y Stx2. La sustitución de este residuo alterará la conformación del bucle  $\beta 5$ - $\beta 6$ , que está implicado no solo en el sitio 1 sino también en el sitio 2 (Perera *et al.*, 1991. *J Bacteriol* 173 (3): 1151-60). La mutagénesis dirigida al sitio también ha demostrado que Arg33 desempeña un papel importante en la citotoxicidad de Stx1 y Stx2. Los resultados pueden explicarse por la amplia implicación de su cadena lateral en los enlaces de hidrógeno a la galactosa terminal de los trisacáridos Gb3 en el sitio 2 (Ling *et al.*, 2000 *Structure* 8 (3): 253-64).

El prototipo de la familia de toxinas Shiga es la Stx producida por *Shigella dysenteriae*, que es casi idéntica a la Stx1 producida por *E. coli*, que difieren en un único aminoácido en la subunidad catalítica (O'Loughlin y Robins-Browne, 2001. *Microbios Infect* 3 (6): 493-507). Tanto Stx1 como Stx2 tienen diferentes variantes, siendo Stx2 la más diversa. La familia de Stx1 consiste en Stx1 y Stx1c, mientras que Stx2 contiene las variantes Stx2c, Stx2c2, Stx2d, Stx2d<sub>activable</sub>, Stx2e y Stx2f. Stx1 y Stx2 solo tienen una identidad del 56% con el nivel de secuencia de aminoácidos (Jackson *et al.*, 1987. *Microb Pathog* 2 (2): 147-53). Las variantes de Stx2 son homólogas en el 84-99% con respecto a Stx2.

Aunque existen similitudes significativas entre Stx1 y Stx2 en su estructura básica, reconocimiento de receptores y mecanismos de acción bioquímicos, existen diferencias considerables en el impacto clínico de los pacientes infectados con cepas de ECEH que producen Stx1, Stx2 o ambas. En principio, podría predecirse que tanto Stx1 como Stx2 pondrían al paciente en riesgo de desarrollar SUH. Sin embargo, numerosos estudios epidemiológicos

han demostrado que las cepas productoras de Stx2 se asocian más frecuentemente con el desarrollo de SUH que las cepas productoras de Stx1 o las cepas que producen ambas toxinas (Scotland *et al.*, 1987. *Epidemiol Infect* 99 (3): 613-24; Ostroff *et al.*, 1989. *J Infect Dis* 160 (6): 994-8; Donohue-Rolfe *et al.*, 2000. *J Infect Dis* 181 (5): 1825-9).

5 Con respecto a las diferencias entre Stx1 y Stx2, las más significativas son las diferencias en las afinidades por el receptor Gb3 y la capacidad para inducir toxicidad. Aunque Stx1 y Stx2 tienen el mismo receptor funcional, Stx1 tiene una afinidad 10 veces mayor por Gb3 en comparación con Stx2 (Head *et al.*, 1991. *Biol Chem* 266 (6): 3617-21). Un estudio que usó el sistema BIAcore mostró que, aunque la velocidad de asociación de Stx1 a Gb3 es mayor que para Stx2, la disociación de Stx2 del receptor es más lenta que para Stx1, lo que indica que, mientras que Stx2 se une al receptor más lentamente, también se disocia a una velocidad más lenta (Nakajima *et al.*, 2001. *J Biol Chem* 276 (46): 42915-22).

15 A pesar de la mayor afinidad de Stx1 por Gb3, y de manera acorde a los estudios epidemiológicos, Stx2 tiene una dosis letal en ratones del 50% (DL<sub>50</sub>), 400 veces menor que para Stx1 (Tesh *et al.*, 1993. *Infect Immun* 61 (8): 3392-402). También se obtuvieron resultados similares cuando se trataron células endoteliales microvasculares renales humanas con Stx1 o Stx2, y se descubrió que Stx2 era aproximadamente 1000 veces más tóxica (Louise y Obrig, 1995. *J Infect Dis* 172 (5): 1397-401). Diferentes estudios han dejado claro que las subunidades B son determinantes críticos de la toxicidad diferencial de Stx1 y Stx2 *in vivo*. En ensayos de inhibición de la traducción *in vitro* libres de células, las toxicidades de las subunidades Stx1 y Stx2 A son indistinguibles, lo que sugiere que las actividades enzimáticas de estas subunidades no son responsables de las grandes diferencias *in vivo* entre las dos toxinas. En cambio, los modelos animales que comparan la toxicidad de Stx de tipo natural y química demuestran que la presencia de la subunidad Stx2B es un determinante crítico de letalidad *in vitro* e *in vivo* (Weinstein *et al.*, 1989. *Infect Immun* 57 (12): 3743-50; Head *et al.*, 1991. *Biol Chem* 266 (6): 3617-21; Lingwood, 1996. *Trends Microbiol* 4 (4): 147-53; Marcato *et al.*, 2003. *Infect Immun* 71 (10): 6075-8).

25 Usando técnicas de espectrometría de masas, Kitova *et al.* notificaron que Stx1B era principalmente pentamérica a concentraciones de subunidad que oscilaban desde 5 hasta 85  $\mu$ M, independientemente de la fuerza iónica (Kitova *et al.*, 2005. *J Am Soc Mass Spectrom* 16 (12): 1957-68; Kitova *et al.*, 2009. *Biochemistry* 48 (23): 5365-74). Estos datos estuvieron respaldados por estudios de difracción circular (DC) y calorimetría dinámica de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) de Stx1B que muestran un pentámero altamente termoestable (Pina *et al.*, 2003. *Biochemistry* 42 (31): 9498-506). En cambio, el grado de ensamblaje de la subunidad Stx2B depende en gran medida de la temperatura, la concentración de subunidad y la fuerza iónica. A una concentración de subunidad de más de 50  $\mu$ M, la subunidad Stx2B existe predominantemente como un pentámero, aunque también son evidentes multímeros más pequeños (dímero, trímero y tetramero). A menores concentraciones, la subunidad Stx2B existe predominantemente como monómeros y dímeros. Conrady y sus colaboradores confirmaron y cuantificaron las diferencias observadas por Kitova *et al.* (2005) en una técnica directa en estado de disolución. Estos autores notificaron que el pentámero Stx2B es aproximadamente 50 veces menos estable en disolución a pH 7,4 que el pentámero Stx1B (Conrady *et al.*, 2010. *PLoS One* 5 (12): e15153).

40 Otra diferencia importante entre Stx1 y Stx2 se observa a nivel inmunológico. Aunque estos dos tipos de Stx se identificaron inicialmente porque los anticuerpos dirigidos contra una variante no producían reacción cruzada contra la otra, el estudio de reactividad cruzada (y neutralización cruzada) entre estas dos toxinas ha sido objeto de controversia a lo largo de los años. Algunos estudios *in vitro* indican que estas dos toxinas son distintas serológicamente y que los anticuerpos dirigidos contra una toxina no son capaces de neutralizar la otra (Scotland *et al.*, 1985. *Lancet* 2 (8460): 885-6; Karmali *et al.*, 1986. *Lancet* 1 (8473): 164-5; Strockbine *et al.*, 1986. *Infect Immun* 53 (1): 135-40). De manera similar, Wen *et al.* demostraron que la inmunización de ratones con toxoides de Stx1 o Stx2 genéticamente inactivados fue capaz de generar IgG sérica anti-toxina contra toxinas homólogas pero no heterólogas y que estos anticuerpos proporcionaron inmunidad protectora específica frente a la exposición sólo a la toxina homóloga (Wen *et al.*, 2006. *Vaccine* 24 (8): 1142-8). Sin embargo, en otros estudios con animales inmunizados con preparaciones de toxoides de Stx1 o Stx2, los animales mostraron protección cruzada frente a la exposición a cualquiera de las toxinas debido a la producción de anticuerpos contra la subunidad A. Bielaszewska *et al.* hallaron que la inmunización de conejos con los toxoides Stx1 o Stx2 químicamente inactivados, o las subunidades A de cada toxina, impedía la localización de la toxina heteróloga en los tejidos diana durante el desarrollo de la patología sistémica mediada por la toxina. En ese estudio, las subunidades B de Stx1 o Stx2 no proporcionaron protección heteróloga (Bielaszewska *et al.*, 1997. *Infect Immun* 65 (7): 2509-16). Se notificaron evidencias adicionales de protección cruzada *in vivo* por Ludwig *et al.*, cuando se obtuvo protección de conejos frente a la exposición a Stx1 mediante inmunización con un toxoide de Stx2 químicamente inactivado (Ludwig *et al.*, 2002. *Can J Microbiol* 48 (1): 99-103).

60 La reactividad cruzada entre las subunidades B de Stx también es controvertida. Algunos estudios han demostrado que los anticuerpos contra las subunidades B de Stx1 o Stx2 no proporcionan protección cruzada (Wadolowski *et al.*, 1990. *Infect Immun* 58 (12): 3959-65; Bielaszewska *et al.*, 1997. *Infect Immun* 65 (7): 2509-16). Por este motivo, varios autores han propuesto el uso de proteínas de fusión entre Stx2B y Stx1B para proporcionar protección frente a ambas toxinas (Gao *et al.*, 2009. *Vaccine* 27 (14): 2070-6; Zhang *et al.*, 2011. *Vaccine* 29 (22): 3923-9). Sin embargo, Tsuji *et al.* notificaron que la inmunización intranasal de ratones con la construcción Stx2B-HIS (Stx2B con una cola de histidina) pudo conferir protección cruzada frente a Stx1 pero que lo contrario no era cierto (Tsuji *et al.*,

2008. *Vaccine* 26 (17): 2092-9).

Las variantes de Stx2 pueden distinguirse por diferencias en la actividad biológica, la reactividad inmunológica o la especificidad de receptor. Stx2 y sus variantes se unen preferentemente al glucoesfingolípido Gb3, con la excepción de Stx2e, que se une preferentemente a la globotetraosilceramida (Gb4) (Lingwood, 1996. *Trends Microbiol* 4 (4): 147-53). Mientras que Stx2 y Stx2c son las variantes de Stx2 más virulentas, y están asociadas con la mayoría de los casos de SUH (Boerlin *et al.*, 1999. *J Clin Microbiol* 37 (3): 497-503), Stx2e es la única no asociada con colitis hemorrágica y SUH en humanos y, en cambio, es responsable de la enfermedad de edema en cerdos (MacLeod *et al.*, 1991. *Vet Pathol* 28 (1): 66-73). Además, Stx2d<sup>activable</sup> se diferencia de todos los demás tipos de Stx en que puede activarse por elastasa, un componente de la mucosidad intestinal que escinde los dos últimos residuos de la subunidad A para liberar el fragmento A2 (Scheiring *et al.*, 2008. *Pediatr Nephrol* 23 (10): 1749-60).

A pesar de la magnitud de los problemas socioeconómicos provocados por las infecciones por ECEH, actualmente no hay vacunas autorizadas ni terapias eficaces disponibles para uso humano. Uno de los mayores retos es desarrollar un inmunógeno eficaz y seguro para garantizar la ausencia de toxicidad, pero también un fuerte aporte al sistema inmunitario del huésped para inducir anticuerpos duraderos y de alta afinidad que garanticen una buena capacidad de neutralización en suero. La subunidad B de Stx2 (Stx2B) es el candidato más atractivo porque, entre la familia de Stx, Stx2 es la toxina más patógena, y un inmunógeno basado en Stx2B protegería frente a la Stx más relacionada con el desarrollo del SUH (Smith *et al.*, 2006. *Vaccine* 24: 4122-4129; Wen *et al.*, 2006. *Vaccine* 24 (8): 1142-8; Tsuji *et al.*, 2008. *Vaccine* 26 (17): 2092-9). Además, la subunidad B representa la unidad de unión de la toxina y no es tóxica para las células de mamíferos (Donohue-Rolfe *et al.*, 1991. *Rev Infect Dis* 13 Supl. 4: S293-297; Lingwood, 1996. *Trends Microbiol* 4 (4): 147-53). Los anticuerpos capaces de bloquear el proceso de unión al receptor específico (Gb3) en las células de mamíferos deben evitar la primera etapa de la cascada de toxicidad (Ling *et al.*, 1998. *Biochemistry* 37 (7): 1777-88). Además, una vacuna basada en Stx contra el SUH no solo protegería frente a cepas de ECEH conocidas, normalmente serotipos O157 y no O157, sino que también sería útil contra cepas patógenas nuevas o raras de *E. coli* productora de toxinas Shiga, como fue el caso del reciente brote grande de SUH provocado por la cepa O104:H4 (Beutin *et al.*, 2012. *J Virol* 86: 10444-10455; Scheutz *et al.*, 2011. *Euro Surveill* 16).

A pesar de los múltiples enfoques, no se ha obtenido un inmunógeno basado en Stx2B satisfactorio, principalmente porque Stx2B es un inmunógeno muy débil (Marcato *et al.*, 2001. *J Infect Dis* 183: 435-443; Imai *et al.*, 2004. *Infect Immun* 72 (2): 889-895). Dos de los tres sitios de unión están formados por residuos aportados por monómeros vecinos, lo que requiere el ensamblaje correcto del pentámero para que los sitios de unión sean activos (Ling *et al.*, 1998. *Biochemistry* 37 (7): 1777-88). Tal como se comentó anteriormente, el pentámero Stx2B es solo marginalmente estable en ausencia de la subunidad A, y cuando se usa como inmunógeno, no puede generar anticuerpos específicos contra epítomos conformacionales que están ubicados principalmente en las superficies de contacto entre los monómeros del pentámero.

El documento WO2005/121330 describe proteínas quiméricas aisladas de lumazina sintasa modificada. Por ejemplo, se describe una proteína quimérica entre BLS y el péptido OMP31 de *Brucella*.

El documento CN102532324 describe la preparación y aplicación de la vacuna de subunidad modificada por ingeniería genética de *Brucella*. Por ejemplo, se describe una proteína quimérica entre BLS y L7/L12 ribosómico de *Brucella*.

Alvarez *et al.*, 2013 *Vaccine*, vol. 31, n.º 5, págs. 806-812 describe que las repeticiones en tándem del dominio extracelular de la proteína de la gripe Matrix 2 expuesta en la molécula transportadora decamérica de lumazina sintasa de *Brucella* inducen protección en ratones.

Bellido *et al.* 2009, *Vaccine*, vol. 27, n.º 1, págs. 136-145 describe lumazina sintasa de *Brucella* spp. como un sistema de administración de antígeno de rotavirus bovino.

Marcato *et al.*, 2000, *J Infectious Diseases*, vol. 183, n.º 3, págs. 435-443 describe el potencial inmunoproláctico de la subunidad 2B de toxina Shiga clonada.

Bentacor *et al.*, 2009, *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 16, n.º 5, págs. 712-718 describe una vacuna de ADN que codifica para las subunidades A2 y B de toxina similar a Shiga de *Escherichia coli* enterohemorrágica que confiere inmunidad protectora frente a la exposición a toxina Shiga en un modelo murino.

## 60 **Divulgación de la invención**

Los inventores han descubierto sorprendentemente que puede producirse un antígeno de Stx estable no patógeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria adecuada para la inmunización y/o producción de anticuerpos contra Stx creando un péptido quimérico que comprende un monómero de la subunidad B de toxina Shiga tipo 2 (Stx2B) fusionado a un monómero de lumazina sintasa de *Brucella* (BLS). Inesperadamente, cuando tales péptidos quiméricos forman un complejo oligomérico de cinco monómeros idénticos, los epítomos conformacionales en la

subunidad B de Stx2 se estabilizan, haciendo que la proteína de fusión BLS-Stx2B altamente estable sea un valioso inmunógeno en la lucha contra el SUH.

Por tanto, según un primer aspecto, la presente invención comprende una proteína quimérica que comprende un péptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 95% con el monómero de la subunidad B de la toxina Shiga tipo 2 de SEQ ID NO: 1, fusionándose dicho péptido directamente o a través de un ligador peptídico a un monómero de lumazina sintasa de *Brucella*, en la que el monómero de lumazina sintasa de *Brucella* tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 9; y el monómero de la subunidad B de la toxina Shiga 2 se une al extremo N-terminal de dicho monómero de lumazina sintasa de *Brucella* por un ligador peptídico; y dicho ligador peptídico es un péptido flexible G/S; y dicho ligador peptídico tiene una longitud de entre 5 y 15 aminoácidos;

y en la que dicha proteína quimérica forma un complejo oligomérico de cinco monómeros idénticos que conserva la configuración nativa de los epítomos conformacionales de la subunidad B de toxina Shiga 2 que constituyen los sitios de unión a Gb3.

La subunidad B de la toxina Shiga tipo 2 puede fusionarse directamente o a través de un ligador peptídico al extremo N-terminal de un monómero de lumazina sintasa de *Brucella*. Por "el extremo N-terminal de un monómero de lumazina sintasa de *Brucella*" se refiere a cualquiera de los diez aminoácidos más amino-terminales, tales como el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno o décimo aminoácido del extremo amino-terminal.

El monómero de lumazina sintasa de *Brucella* puede tener una identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 9, tal como una identidad de secuencia de al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o más.

El monómero de lumazina sintasa de *Brucella* puede tener uno o más reemplazos, deleciones y/o inserciones dentro de las primeras 8 posiciones de aminoácido N-terminales, de modo que la combinación de deleciones e inserciones no da como resultado una elongación de más de 5 aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 9. Por ejemplo, el monómero de lumazina sintasa de *Brucella* puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho reemplazos, deleciones y/o inserciones dentro de las primeras 8 posiciones de aminoácido N-terminales de modo que la combinación de deleciones e inserciones no da como resultado una elongación de más de 5 aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 9.

En una realización preferida de la invención, el monómero de subunidad B de la toxina Shiga (SEQ ID NO: 1) se une al extremo N-terminal del monómero de lumazina sintasa de *Brucella* por un ligador peptídico, tal como un péptido flexible G/S, que puede ser un péptido flexible G/S que tiene entre 2 y 20 aminoácidos de longitud, o entre 5 y 15 aminoácidos de longitud, tales como péptidos quiméricos que comprenden las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 7, y preferiblemente SEQ ID NO: 5 de aminoácidos.

Según otro aspecto, la presente invención comprende un complejo oligomérico proteico caracterizado porque comprende un dímero de pentámeros de la proteína quimérica de la invención.

Según un aspecto adicional, la presente invención comprende un polinucleótido que codifica para la proteína quimérica de la invención, tal como una molécula de ADN que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8, y preferiblemente SEQ ID NO: 6.

Según aún otro aspecto, la presente invención comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica para la proteína quimérica de la invención, tal como un vector que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8, y preferiblemente SEQ ID NO: 6.

La presente invención también comprende una célula transgénica que comprende el polinucleótido o vector de la invención. En una realización particular, la célula transgénica es una célula de *E. coli*, preferiblemente una célula BL21 (DE3) de *E. coli*. En otra realización, la célula transgénica es una célula de mamífero, preferiblemente una célula 293T. En aún otra realización, la célula transgénica es una célula de *Pichia pastoris*.

Otro aspecto de la invención comprende una composición farmacéutica que comprende el complejo oligomérico proteico y/o el vector de la invención y un vehículo farmacéuticamente adecuado. La composición farmacéutica de la invención es preferiblemente una vacuna. En una realización preferida, en la vacuna de la invención, el complejo oligomérico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7, y preferiblemente SEQ ID NO: 5.

Un aspecto adicional de la presente invención comprende un método de producción de la proteína quimérica de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de a) cultivar una célula transgénica de la invención que comprende el polinucleótido o vector de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína quimérica, y b) recuperar dicha proteína quimérica.

En aún otro aspecto, la invención comprende un método para obtener un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad B de la toxina Shiga 2, estando caracterizado dicho método porque comprende las etapas de:

- 5 a) administrar a un mamífero el complejo oligomérico proteico de la invención con un esquema de inmunización adecuado para provocar anticuerpos neutralizantes contra dicho complejo oligomérico,
- b) obtener de dicho mamífero una muestra biológica que contiene dichos anticuerpos neutralizantes y/o células capaces de producir dichos anticuerpos neutralizantes, y
- 10 c) usar dicha muestra biológica como fuente de dicho anticuerpo.

En una realización preferida del método de la invención para obtener un anticuerpo, la muestra biológica obtenida en la etapa b) contiene células B, que se usan en la etapa c) para producir un hibridoma. En una realización preferida, el mamífero al que se administra el complejo oligomérico proteico es un ratón. En otra realización preferida, el mamífero al que se administra el complejo oligomérico proteico es un camélido.

En otro aspecto, se describe un método de reducción de la carga bacteriana de *Escherichia coli* enterohemorrágica en un animal, tal como ganado vacuno, mediante la administración del complejo oligomérico de la invención al animal en el que se desea una reducción de la carga bacteriana.

En otro aspecto, se describe un método de reducción de la carga bacteriana de *Escherichia coli* enterohemorrágica en un animal, tal como ganado vacuno, mediante la administración de un anticuerpo de la invención al animal en el que se desea una reducción de la carga bacteriana.

Según aún otro aspecto adicional, se describe un método de inducción de resistencia frente al síndrome urémico hemolítico (SUH) en un sujeto mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto mamífero la vacuna de la invención, tal como una vacuna que comprende un complejo oligomérico de la invención que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, y preferiblemente SEQ ID NO: 5. Según aún otro aspecto adicional, la invención comprende la vacuna de la invención para su uso en un método de inducción de resistencia frente al síndrome urémico hemolítico (SUH) en un sujeto mamífero.

Según aún un aspecto adicional, la invención comprende el uso de la proteína quimérica de la invención en la fabricación de un medicamento para inducir resistencia frente al síndrome urémico hemolítico (SUH) en un sujeto mamífero.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un complejo oligomérico proteico, que comprende un dímero de pentámeros de la proteína quimérica de la invención y un portador farmacéuticamente adecuado. Las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles, por ejemplo, en un método para tratar o prevenir el síndrome urémico hemolítico (SUH) en un sujeto que lo necesite, que es aún otro aspecto de la invención. Tal método se usa preferiblemente para tratar o prevenir el síndrome urémico hemolítico (SUH) en un sujeto humano,

#### 45 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Estructura teórica de las quimeras BLS-Stx2B-L5 (panel A) y BLS-Stx2B-L10 (panel B) y BLS-Stx2B-L15 (panel C). Se modeló la estructura de estas proteínas tal como se describe en el ejemplo 1. Los monómeros de BLS son de color negro, mientras que los monómeros de Stx2B fusionados a la estructura de BLS son de color gris claro. Los ligadores (GSGSG) entre Stx2B y BLS son de color gris oscuro. La figura se construyó con el programa Pymol Molecular Graphics Systems.

Figura 2. Análisis mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western de los recombinantes Stx2B-BLS. Stx2-BLS expresado y purificado (L10) se separó mediante SDS-PAGE al 15% y se tiñó con azul de Coomassie (A y B), o se reveló con anticuerpos específicos (C). Se realizó el mismo protocolo para las tres quimeras. A) Carril 1, proteínas totales de BL21 de *E. coli* transformado con pET-Stx2B-BLS no inducido (DE3); carril 2, sedimentos insolubles de BL21 (DE3) de *E. coli* transformado con pET-Stx2B-BLS inducido; carril 3, fracción soluble de BL21 (DE3) de *E. coli* transformado con pET-Stx2B-BLS inducido; B) Carril 1, Stx2B purificada; carril 2: BLS purificada; carril 3: Stx2B-BLS purificado. C) Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de Stx2B-BLS purificado. Se examinó con sonda SDS-PAGE con IgG policlonal de ratón anti-Stx2 (carriles 1 y 2) o policlonal IgG de ratón anti-BLS (carriles 3 y 4) y se reveló con IgG de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa. Carril 1: Stx2B purificada; carril 2: Stx2B-BLS purificado; carril 3: BLS purificada; carril 4: Stx2B-BLS purificado. D) SDS-Page de las proteínas purificadas. Carril 1, Stx2B purificada; carril 2, BLS purificada; carril 3, Stx2B-BLS L5 purificado; carril 4 Stx2B-BLS L10 purificado; carril 5 Stx2B-BLS L15 purificado.

Figura 3. Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de las células 293T transfectadas con el plásmido

pCineo-BLS-Stx2B-L5, pCineo-BLS-Stx2B-L10 y pCineo-BLS-Stx2B-L15. Carril 1, BLS purificada; carril 2, células transfectadas con el plásmido pCineo vacío; carril 3, control negativo del ensayo de transfección; carril 4, células transfectadas con BLS-Stx2B-L5; carril 5 células transfectadas con BLS-Stx2B L10; carril 6, células transfectadas con BLS-Stx2B-L15.

5  
Figura 4. Comparación de los tres espectros de UV lejano-DC de BLSwt (línea discontinua de color negro), Stx2B (línea continua de color negro) y BLS-Stx2B (línea continua de color gris). El espectro teórico de cada quimera BLS-Stx2B, calculado a partir de la combinación de los espectros de Stx2B y BLS, está representado por una línea discontinua de color gris.

10  
Figura 5. Cromatografía de exclusión molecular (columna analítica S200) acoplada al análisis mediante SLS de las tres quimeras BLS-Stx2B. Todas las separaciones se realizaron a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. La elución se monitorizó mediante señales de índice de refracción (línea continua) y UV280 nm (línea discontinua). El peso molecular de cada muestra se calculó relacionando sus señales de 90° e IR, y comparando este valor con el obtenido para BSA como patrón. El primer pico corresponde a agregados de alto PM, el mayoritario corresponde a la quimera BLS-Stx2B.

15  
Figura 6. *Desnaturalización térmica de BLS seguido de la señal de DC de proteínas a 222 nm en función de la temperatura.* Tipo natural (línea discontinua de color negro), Stx2B (línea continua de color negro) BLS-Stx2B L5 (línea continua de color gris oscuro), BLS-Stx2B L10 (línea continua de color gris) y BLS-Stx2B L15 (línea continua de color gris claro).

20  
Figura 7. *Evaluación del ensamblaje de BLS-Stx2B y el ensayo ELISA de unión a Gb3.* Se añadieron BLS-Stx2B-L5, BLS-Stx2B-L10, BLS-Stx2B-L15, BLS, rStx2 diluidos en serie o lisado de BL21 de *E. coli* (usado como control negativo para la unión inespecífica) a las placas recubiertas con Gb3. La unión se determinó tal como se detalla en el ejemplo 13.

25  
Figura 8. *Transcurso temporal de títulos de IgG específicas contra Stx2B.* A) Se determinaron mediante ELISA los títulos de IgG específicas de Stx2B en sueros de ratones inmunizados con BLS-Stx2B-L10 o Stx2B, ambos formulados en FA. Cada punto de tiempo representa la media  $\pm$  E.E.M. de 4-6 ratones/grupo. \*\* P <0,005 frente al mismo punto de tiempo del grupo de Stx2B. B) Títulos de IgG específicas de Stx2B en sueros de ratones inmunizados con Stx2-BLS-L10 en diferentes formulaciones o regímenes. Cada punto de tiempo representa la media  $\pm$  E.E.M. de 4-6 ratones/grupo. \* P <0,05 frente al mismo punto de tiempo de BLS-Stx2B-L10 con grupo sin adyuvante (N/A); \*\* P <0,005 frente al mismo punto de tiempo de todos los otros grupos. Las puntas de flecha de color negro indican inmunizaciones con proteína; las puntas de flecha de color gris indican inmunizaciones con ADN.

30  
Figura 9. *Subtipos de IgG específicas de Stx2B.* Los sueros de ratones inmunizados con diferentes formulaciones de BLS-Stx2B-L10 se sometieron a ensayo ELISA tal como se detalla en Materiales y métodos. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M. de 4-6 por grupo; \*\*\* P <0,001 frente a IgG2a en cada grupo.

35  
Figura 10. *Curvas de mortalidad.* A) Neutralización *ex vivo* de la toxicidad de rStx2 (1DL<sub>100</sub>) con sueros de ratones inmunizados. Se diluyó una reserva de sueros de cada grupo inmunizado (4-6 ratones/reserva) (45 días tras la última inmunización) o ratones no inmunizados según el título de neutralización *in vitro* tal como se indica en la referencia de la figura. B) Protección de ratones inmunizados frente a una exposición letal a rStx2 purificada. Se expusieron ratones BALB/c macho adultos inmunizados con Stx2B + FA o diferentes formulaciones de BLS-Stx2B; o BLS + FA (4-6 ratones/grupo) a 1 DL100 de rStx2 45 días después de la última inmunización. \* P <0,05 frente a ratones inmunizados con Stx2B + FA y p <0,005 frente a ratones no inmunizados o inmunizados con BLS + FA. \*\* p <0,005 frente a todos los otros grupos.

40  
Figura 11. *Respuesta de anticuerpos de IgG específicas a largo plazo y respuesta inmunitaria protectora.* A) Títulos de IgG específicas contra Stx2B sometidos a ensayo ELISA hasta 9 meses después de la última dosis de inmunización; B) Los ratones que sobrevivieron a la primera exposición a rStx2 recibieron una segunda exposición a 2DL100 de rStx2 en el momento indicado en la parte A (2ª exposición). \*\* P <0,005 en comparación con BLS-Stx2B-L10 con ratones inmunizados sin adyuvante (N/A) o con AH. C) Los ratones que sobrevivieron a las dos primeras exposiciones a rStx2 recibieron una tercera exposición a 3DL100 de rStx2 en el momento indicado en la parte A (3ª exposición). \*\* P <0,005 en comparación con ratones no inmunizados

45  
Figura 12: *Transcurso temporal de títulos de IgG específicas con una dosis de BLS-Stx2B-L10.* Se determinaron mediante ELISA los títulos de IgG específicas de Stx2B en sueros de ratones inmunizados con una dosis de BLS-Stx2B-L10 formulada en AH. Cada punto de tiempo representa la media  $\pm$  E.E.M. de 6 ratones. Las flechas de color gris indican exposiciones a rStx2.

50  
Figura 13: *Curvas de mortalidad.* Protección de ratones inmunizados frente a exposiciones letales de rStx2 purificada. Se expusieron ratones BALB/c adultos no inmunizados o inmunizados con BLS-Stx2B-L10 (una dosis) (4-6 ratones/grupo) a (A): 1 DL100 de rStx2 30 días tras la inmunización, (B): 3 DL100 de rStx2 60 días tras la inmunización y (C): 5 DL100 de rStx2 120 días tras la inmunización. Los diferentes exposiciones se indican en



flechas de color gris en la figura 12. \*\* P <0,005 frente a ratones no inmunizados.

### Descripción detallada de la invención

5 La presente invención propone una nueva estrategia para superar la falta de un inmunógeno basado en Stx2B satisfactorio: la presentación del pentámero de StxB2 en la partícula proteica BLS. BLS (lumazina sintasa de *Brucella*) se ha descrito como un portador muy eficaz para el suministro de antígeno (Laplagne *et al.*, 2004. *Proteins* 57:820-828; Cassataro *et al.*, 2007. *Vaccine* 25:4437-4446; Bellido *et al.*, 2009. *Vaccine* 27: 136-145). BLS es un dímero de pentámeros altamente inmunógeno y estable y un armazón que se ha usado para presentar antígenos foráneos en su estructura (Velikovskiy *et al.*, 2003. *Infect Immun* 71:5750-5755; Zylberman *et al.*, 2004. *J Biol Chem* 279:8093-8101; Bellido *et al.*, 2009. *Vaccine* 27:136-145; Cassataro *et al.*, 2007. *Vaccine* 25:4437-4446; Laplagne *et al.*, 2004. *Proteins* 57:820-828). Sin embargo, puede preverse una gran variedad de dificultades para el uso de un armazón polimérico proteico para la presentación de otra proteína polimérica: a) puede tener lugar la polimerización del antígeno insertado entre diferentes partículas proteicas, produciendo un sobrecruzamiento y una agregación masiva; b) la cinética de plegamiento y asociación de los pentámeros de la subunidad B y BLS podría ser muy diferente, por tanto el plegamiento de la partícula de fusión podría quedar atrapado en un estado intermedio; c) las restricciones estructurales impuestas para el enlace covalente a los pentámeros de BLS no podrían ser adecuadas para estabilizar la estructura pentamérica de la subunidad B; d) la topología del armazón oligomérico puede no ser compatible con la de la diana oligomérica; e) las interacciones entre configuraciones intermedias de las diferentes proteínas podrían impedir el plegamiento y el ensamblaje adecuados de las partículas de fusión; f) la baja estabilidad o baja solubilidad de la diana de fusión podría afectar negativamente a la estabilidad de la agregación de inducción de partícula completa del complejo.

25 La presentación de proteínas completas en estructuras oligoméricas puede verse restringida por una estructura inadecuada de la proteína foránea y por su propensión a experimentar interacciones homoméricas. La propensión de un inserto candidato a experimentar interacciones homoméricas es crítica. La presentación de proteínas no monoméricas en el contexto de estructuras oligoméricas puede ser problemática debido a la reticulación y agregación entre partículas a través de interacciones homoméricas de las subunidades diana. Este fenómeno puede ser incluso peor cuando los protómeros permanecen libres debido a la estequiometría desigual entre el oligómero diana y la BLS.

Hay ejemplos en los que el uso de un armazón polimérico proteico que se sabe que funciona correctamente para la presentación de una proteína monomérica ha dado como resultado un fallo en la presentación correcta de otra proteína polimérica. Por ejemplo, pseudopartículas virales (VLP, *virus-like particles*) de hepatitis B formadas por el HBcAg, se han usado satisfactoriamente para la presentación de eGFP monomérica (Kratz *et al.*, 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (5): 1915-1920) Sin embargo, las variantes de color de dimerización y tetramerización de GFP no pudieron formar VLP (Vogel *et al.*, 2005. *Proteins* 58 (2): 478-488) En este caso, se demostró el papel clave de la estructura cuaternaria del inserto con la formación satisfactoria de VLP cuando se usaron en su lugar variantes monoméricas modificadas por ingeniería. Otro ejemplo fueron los intentos de expresar de manera soluble y mejorar el plegamiento y el ensamblaje del dominio N-terminal extracelular (ECD por sus siglas en inglés) homopentamérico de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) mediante fusión recombinante a proteínas homopentaméricas como la subunidad B de la toxina colérica, la lumazina sintasa icosaédrica de bacterias (formada por 12 pentámeros ensamblados) y lumazina sintasa de levadura, todas las cuales han fallado (Fischer *et al.*, 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98 (6):3567-3570.) El fallo de este enfoque podría atribuirse al comportamiento de plegamiento/asociación de las proteínas fusionadas.

Contra todas las expectativas, la unión de las subunidades Stx2B al armazón de BLS promueve la correcta pentamerización de la toxina y estabiliza de manera espectacular su estructura, en particular su estabilidad termodinámica, tal como lo demuestra un gran aumento de la temperatura de fusión (Tf) desde 60 hasta casi 90°C, superando así la falta de estabilidad mencionada anteriormente de la subunidad B de la toxina Stx2 cuando no está asociada con la subunidad A. Además, la quimera resultante (BLS-Stx2B) muestra una notable capacidad para inducir respuestas inmunitarias humorales duraderas, y es capaz de inducir anticuerpos con alta capacidad neutralizante para Stx2 y sus variantes, hasta el punto de que ratones inmunizados con BLS-Stx2B están completamente protegidos frente a altas dosis letales de exposición a Stx por vía i.p. hasta diez meses después de la última dosis de inmunización. La capacidad de inducir anticuerpos altamente específicos indica que la quimera BLS-Stx2B conserva la configuración nativa de los epítomos conformacionales de Stx2B que constituyen los sitios de unión a Gb3 y permite su presentación eficiente al disolvente.

El mantenimiento de la configuración nativa en la quimera es particularmente sorprendente teniendo en cuenta que el armazón de BLS carece de una proyección central equivalente al extremo carboxilo-terminal de StxA, que en la holotoxina llena el poro central de la estructura similar a un anillo de StxB. Por tanto, en BLS-Stx2B el poro central de Stx2B está desocupado. Los expertos en la técnica esperarían que esto provoque al menos algún cambio en la geometría y/o simetría del pentámero Stx2B y afecte, a su vez, negativamente a sus sitios de unión, particularmente los sitios 1 y 3 que requieren el ensamblaje correcto del pentámero para ser funcionales. El armazón de BLS, sin embargo, parece ser capaz de estabilizar el pentámero Stx2B sin perturbar sus sitios de unión a Gb3.

Tal como se comentó en la sección “Campo técnico”, Stx2 (SEQ ID NO: 1) es la toxina Shiga más patógena, y un inmunógeno basado en Stx2B protegería frente a las variantes de Stx que se encuentra en la mayoría de los casos de desarrollo de SUH (Smith *et al.*, 2006. Vaccine 24:4122-4129; Wen *et al.*, 2006. Vaccine 24 (8): 1142-8; Shimizu *et al.*, 2008. MicrobPathog 35 (1):1-9) Más significativamente, los anticuerpos inducidos por la quimera muestran una capacidad neutralizante similar a Stx2 de tipo natural y sus variantes, presentando incluso una capacidad de neutralización cruzada (por ejemplo, los anticuerpos inducidos por una quimera BLS-Stx2B pueden neutralizar Stx1). Se ha demostrado previamente que todos los sitios de unión a Gb3 en esta familia de toxinas están ubicados en la misma cara del pentámero B, opuesto a la subunidad A. Por tanto, la capacidad de sueros para neutralizar diferentes miembros de la familia de Stx se debería principalmente a anticuerpos que reconocen estos sitios de unión, que se conservan en todos los miembros de la familia de Stx. Este hecho es de gran importancia para la profilaxis o la terapéutica del SUH, porque los anticuerpos que muestran una amplia reactividad frente a los sitios de unión a Gb3 deberían ser altamente eficaces para prevenir el daño provocado por la mayoría de las toxinas de la familia de Stx, lo que hace que esta invención sea promisoría para su uso en futuros brotes provocados por cepas patógenas de *E. coli* productora de toxinas Shiga. Sin restringirse a ninguna explicación particular, los inventores creen que la fuerte respuesta de las células B que se produce cuando se inmunizan ratones, por ejemplo con BLS-Stx2B, podría explicarse por la estabilización termodinámica del pentámero Stx2B y también por la capacidad de BLS para seleccionar como diana y activar células dendríticas (Berguer *et al.*, 2006. J Immunol 176: 2366-2372) Los títulos de ELISA específicos y la actividad de neutralización de los anticuerpos producidos por BLS-Stx2B se mejoran significativamente en comparación con los producidos por Stx2B.

Según un primer aspecto, la presente invención comprende una proteína quimérica que comprende un monómero de la subunidad B de la toxina Shiga 2 (Stx2B) fusionada a un monómero de lumazina sintasa de *Brucella* (BLS).

La subunidad B de la toxina Shiga tipo 2 puede fusionarse directamente o a través de un ligador peptídico al extremo N-terminal de un monómero de lumazina sintasa de *Brucella*. Por “el extremo N-terminal de un monómero de lumazina sintasa de *Brucella*” quiere decirse cualquiera de los diez aminoácidos más amino-terminales, tales como el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno o décimo aminoácido del extremo amino-terminal.

La enzima lumazina sintasa cataliza la penúltima etapa en la ruta de biosíntesis de riboflavina (véase Goldbaum *et al.*, 1999. J. Med. Microbiol., 48: 833-839) Su sitio activo está ubicado en la superficie de contacto entre monómeros, lo que confiere un orden polimérico muy estable a esta proteína (véase Ritsert *et al.*, 1995. J. Mol. Biol., 253: 151-167).

La lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS) es una proteína altamente estable. Los análisis de la función enzimática inmunoquímica y la estructura tridimensional según lo determinado mediante cristalografía de rayos X muestran resultados similares para la proteína nativa y para la proteína expresada de manera recombinante (véanse Braden *et al.*, 2000. J. Mol. Biol., 297:1031-1036; Goldbaum *et al.*, 1999. J. Med. Microbiol., 48:833-839; Goldbaum *et al.*, 1998. J. Struct. Biol., 123:175-178). La estructura muestra que esta proteína de 18 kDa se comporta como un decámero de 180 kDa en disolución, convirtiéndose en un nuevo tipo de disposición cuaternaria de la lumazina sintasa (véase Zylberman *et al.*, 2004. J. Biol. Chem., 279 (9):8093-8101). El análisis de la estructura también muestra que los extremos N-terminales de los monómeros de BLS se presentan en los vértices de un pentámero simétrico a una distancia de 40 ángstroms entre sí, y que los 10 aminoácidos amino-terminales no están involucrados ni en el plegamiento general ni en los contactos entre monómeros. (véase Braden *et al.*, 2000. J. Mol. Biol., 297:1031-1036). Esto significa que parte o la totalidad de al menos los últimos 8 residuos de aminoácido N-terminales de BLS pueden eliminarse o mutarse sin afectar significativamente a su utilidad como portador antigénico. Por consiguiente, en el péptido quimérico de la invención, el resto de BLS puede comprender la secuencia de tipo natural de BLS completa o presentar sustituciones, inserciones o deleciones en uno, varios o todos los aminoácidos en las primeras 8 posiciones de su extremo N-terminal. Sin embargo, dado que varias inserciones que dan como resultado una elongación excesiva en el extremo N-terminal podrían tener efectos negativos, tales como una disminución de la solubilidad y/o la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria, en la proteína quimérica de la invención, la combinación de deleciones e inserciones en el extremo N-terminal del monómero de BLS, preferiblemente no debe dar como resultado una elongación de más de 5 aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 9. En una realización preferida de la invención, se delecionan los primeros 8 aminoácidos en el extremo N-terminal de la lumazina sintasa de *Brucella spp.*

Es bien sabido que es posible cierta variación en la secuencia de aminoácidos de los péptidos mientras se mantienen la totalidad o parte de las propiedades biológicas y la actividad del péptido original. También se sabe que las posibilidades de disminuir o perder la actividad biológica aumentan con el grado de desviación de la secuencia original. Por consiguiente, los péptidos quiméricos en los que el monómero de BLS presenta cierta variación con respecto a la secuencia de BLS de tipo natural también forman parte de la presente invención, en particular aquellos en los que el monómero de BLS tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% (por ejemplo, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más) con SEQ ID NO: 9 (sin considerar las primeras 8 posiciones de aminoácido, tal como se comentó anteriormente). De manera similar, los péptidos quiméricos en los que la subunidad B de la toxina Shiga tipo II tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 95% (por ejemplo, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más) por secuencia con la subunidad B de toxina Shiga tipo II de tipo natural también está dentro del alcance

de la presente invención.

La fusión de la subunidad B del monómero de toxina Shiga tipo 2 al monómero de BLS puede lograrse directamente en la presente invención (es decir, mediante el establecimiento de una unión peptídica entre el extremo C-terminal del monómero de subunidad B y el extremo N-terminal del monómero de BLS), o a través de un ligador peptídico. El ligador peptídico es preferiblemente un péptido G/S, y puede tener entre 2 y 20 aminoácidos de longitud, o entre 5 y 15 aminoácidos de longitud, incluyendo 5, 10 ó 15 aminoácidos de longitud, tales como péptidos quiméricos que comprenden SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 7, y preferiblemente SEQ ID NO: 5 de aminoácidos.

Cuando se expresan de manera recombinante, las proteínas quiméricas de la invención tienden a adoptar la configuración típica de BLS, es decir, un dímero de pentámeros. En este complejo oligomérico, los cinco restos de BLS de cada pentámero se enfrentan a los cinco monómeros de BLS del otro pentámero, y los cinco restos de Stx de cada pentámero están expuestos en los extremos opuestos del decámero. Los cinco monómeros de Stx en cada pentámero conservan así la configuración molecular de Stx nativa, y como resultado se conservan los sitios de unión a trisacáridos de la subunidad B nativa. Junto con su estabilidad aumentada, la conservación de los epítopos conformacionales de la subunidad B de Stx en el decámero BLS-Stx los hace particularmente útiles como desencadenantes de una respuesta inmunitaria eficaz y segura. Por tanto, según otro de sus aspectos, la presente invención comprende un complejo oligomérico proteico que comprende o que consiste en dos pentámeros de la proteína quimérica de la invención. Tal complejo oligomérico proteico es útil tanto como inmunógeno para inmunizar un mamífero, tal como un humano, contra el SUH, como para obtener anticuerpos anti-Stx y derivados de los mismos útiles en el tratamiento del SUH.

Los polinucleótidos artificiales que codifican para la proteína quimérica de la invención, útiles para producir la proteína quimérica de la invención y también capaces de inducir respuestas celulares o humorales cuando se administran a un animal, también forman parte de la invención. Tales polinucleótidos son, por ejemplo, pero sin limitarse a, ARN, ADN genómico o ADNc. En una realización preferida, el polinucleótido que codifica para la proteína quimérica de la invención comprende una molécula de ADN que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8, y más preferiblemente SEQ ID NO: 6. Los polinucleótidos que codifican para la proteína quimérica de la invención son útiles, por ejemplo, en la construcción de vectores tales como, pero sin limitarse a, vectores bacterianos o virales. Dichos vectores son capaces de expresar o facilitar la expresión de las proteínas quiméricas de la presente invención, y constituyen otro aspecto de la presente invención. Los vectores que comprenden polinucleótidos que codifican para la proteína quimérica de la invención pueden producirse mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica. Como ejemplo, tales vectores pueden producirse insertando los polinucleótidos que codifican para la proteína quimérica de la invención en apCi-neo (Promega, EE.UU.). En realizaciones preferidas de la invención, los vectores comprenden un polinucleótido que codifica para la proteína quimérica de la invención de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 8, y más preferiblemente SEQ ID NO: 6.

En una realización de la invención, el vector que comprende el polinucleótido que codifica para la proteína quimérica de la invención se usa para producir una célula transgénica que expresa la proteína quimérica de la invención. Tales células transgénicas constituyen otro aspecto de la presente invención. Las células que pueden transformarse en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de insectos, bacterias, tales como *Escherichia coli*, levaduras tales como *Pichia pastoris*, y células de mamíferos, tales como CHO, COS, BHK, Namalwa y HeLa. En una realización preferida de la invención, las células transgénicas son células de *Escherichia coli*, preferiblemente BL21 (DE3) de *E. coli*. Las células transgénicas también pueden ser células de mamífero, tales como células 293T o células de *Pichia pastoris*.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el complejo oligomérico proteico de la invención y/o el vector que comprende el polinucleótido que codifica para la proteína quimérica de la invención. Los agentes activos de los compuestos farmacéuticos o las vacunas de esta invención están presentes en dosis fisiológicas eficaces.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención es una vacuna en la que el complejo oligomérico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7, y preferiblemente SEQ ID NO: 5. La vacuna de la invención es, según otra realización de la invención, una vacuna de ADN que comprende un vector que comprende el polinucleótido que codifica para la proteína quimérica de la invención.

La composición farmacéutica de la invención es preferiblemente una vacuna útil en la inducción de resistencia frente al síndrome urémico hemolítico (SUH) en un sujeto mamífero, y/o en la producción de anticuerpos anti-Stx. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables los conocen bien los expertos en la técnica, y su naturaleza precisa depende del tipo de formulación y su vía de administración pretendida, e incluyen disolventes y diluyentes tales como agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares, dispersantes, recubrimientos, agentes estabilizantes tales como albúmina y sales alcalinas de EDTA, agentes conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, etc. En el caso de formulaciones sólidas, tales como las

pretendidas para su administración oral, los portadores incluyen manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

5 Las composiciones de vacuna de la presente invención incluyen tanto vacunas terapéuticas, administradas después de la infección inicial o después del brote de la enfermedad y destinadas a mejorar o curar la enfermedad, así como vacunas profilácticas, administradas antes de la infección y destinadas a prevenirla. Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden prepararse mediante métodos convencionales que conocen bien los expertos en la técnica. Preferiblemente, las composiciones de vacuna de la invención incluyen un portador farmacéuticamente aceptable, tal como se describió anteriormente. Las composiciones de vacuna contienen preferiblemente un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes son, pero sin limitarse a, emulsiones de aceite en agua, tales como adyuvante de Freund, compuestos de aluminio, liposomas, polímeros de bloque no iónicos, saponinas y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA). Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden administrarse por cualquiera de las vías habituales, incluyendo pero sin limitarse a la vía oral, nasal e inyectable (tal como vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, etc.).

15 Las formulaciones farmacéuticas, tales como vacunas, de la presente invención pueden estar en estado líquido o en cualquier otra forma farmacéutica conocida en la técnica, tal como emulsiones inyectables. Los compuestos farmacéuticos o las vacunas descritos en la presente invención también pueden estar en comprimidos, disoluciones líquidas, suspensiones o elixires para administración oral o en líquidos estériles tales como disoluciones o suspensiones. Preferiblemente, se usa un medio inerte, tal como medios salinos, tampones de fosfato-solución salina y cualquier otro medio en el que las proteínas quiméricas, secuencias de nucleótidos o segmentos de los mismos tienen una solubilidad adecuada.

20 Las composiciones farmacéuticas que contienen el complejo oligomérico proteico de la invención y/o el vector que comprende el polinucleótido que codifica para la proteína quimérica de la invención son útiles en un método de inducción de resistencia frente al síndrome urémico hemolítico (SUH) en un sujeto mamífero, que también forma parte de la invención. En dicho método, dicha composición se administra a dicho sujeto mamífero. La dosis, el programa de vacunación y la necesidad de dosis de refuerzo dependerán de la especie de mamífero, el estado higiénico, la edad y la talla del sujeto, entre otros factores, y los expertos en la técnica pueden determinarlo fácilmente.

25 Un método para producir la proteína quimérica que comprende un monómero de la subunidad B de la toxina Shiga tipo 2 fusionada al extremo N-terminal de un monómero de lumazina sintasa de *Brucella* (BLS) también está dentro del alcance de esta invención. Dicho método comprende las etapas de a) cultivar una célula transgénica que comprende un polinucleótido que codifica para la proteína quimérica de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína quimérica; y b) recuperar dicha proteína quimérica. Tal como se explicó anteriormente, cuando se expresa de manera recombinante, la proteína quimérica de la invención adopta la configuración típica de BLS, es decir, un dímero de pentámeros, autoensamblándose para dar el complejo oligomérico de la invención. La célula transgénica usada en este método puede ser cualquiera de las células transgénicas de la invención, incluyendo pero sin limitarse a células de *E. coli*, tales como BL21 (DE3) de *E. coli*, células de *Pichia pastoris* y células de mamífero, tales como células 293T. La proteína expresada por las células transformadas puede luego recuperarse y purificarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como mediante métodos cromatográficos.

35 Gracias a su estabilidad aumentada en comparación con la versión no quimérica de la subunidad B de Stx2, el complejo oligomérico proteico de la invención es particularmente útil como inmunógeno para obtener anticuerpos que se unen específicamente a la subunidad B de la toxina Shiga que tienen, a su vez, aplicaciones médicas y de diagnóstico que resultan obvias fácilmente para los expertos en la técnica. Por tanto, la capacidad del complejo oligomérico de la invención para provocar una respuesta inmunitaria permite su uso en un método para producir anticuerpos que se unen específicamente a la subunidad B de la toxina Shiga, estando también tal método dentro del alcance de la presente invención. Tal método comprende las etapas de a) administrar a un mamífero no humano el complejo oligomérico proteico de la invención con un esquema de inmunización adecuado para producir anticuerpos neutralizantes contra dicha proteína quimérica; b) obtener a partir de dicho mamífero una muestra biológica que contiene dichos anticuerpos neutralizantes y/o células capaces de producir dichos anticuerpos neutralizantes; y c) usar dicha muestra biológica como fuente para dicho anticuerpo. La muestra biológica puede ser de diferentes tipos, y su naturaleza precisa dependerá del método particular mediante el que se obtiene el anticuerpo de la invención en la etapa c). Por ejemplo, la muestra biológica puede ser sangre, de la que puede obtenerse suero que contiene un anticuerpo policlonal. Según una realización preferida de la invención, la muestra biológica de la etapa b) comprende o consiste en células B, que se usan en la etapa c) para producir un hibridoma productor de anticuerpos. La tecnología de hibridoma la conocen bien los expertos en la técnica y se ha convertido en una práctica convencional en el campo de los anticuerpos. Por ejemplo, los esplenocitos de un ratón inmunizado frente a BLS-Stx2B pueden fusionarse con células de mieloma para obtener un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales. En una realización más preferida de la invención, el mamífero inmunizado en la etapa a) es un camélido, tal como un llama, y la muestra biológica es sangre que contiene linfocitos. A partir de estos linfocitos, se obtienen segmentos de genes que codifican para dominios VHH específicos y se usan para producir de manera recombinante fragmentos VHH que se unen específicamente a la subunidad B de la toxina Shiga. Debido a su

pequeño tamaño y a su solubilidad y estabilidad aumentadas, los fragmentos VHH (también denominados anticuerpos de un solo dominio y nanocuerpos en otros lugares) son más fáciles de formular y administrar, y pueden usarse para seleccionar como diana epítomos que generalmente no alcanzan los anticuerpos convencionales.

5 Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos obtenidos mediante el método de la invención se unen específicamente a la subunidad B de la toxina Shiga, se producen contra los epítomos conformacionales de la proteína química de la invención y son capaces de neutralizar eficientemente la toxina Shiga *in vivo*. Estos anticuerpos pueden ser de diferentes fuentes dependiendo del animal que se inmunice con la proteína química de la invención. Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos de ratón, humanos o camélidos o fragmentos de unión a anticuerpo de los mismos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o fragmentos de unión a anticuerpos de los mismos. Sin embargo, los anticuerpos obtenidos a través del método de la invención son preferiblemente anticuerpos monoclonales o anticuerpos recombinantes o fragmentos de unión a anticuerpo de los mismos, tales como anticuerpos monoclonales de ratón o anticuerpos de llama o fragmentos de unión a anticuerpo de los mismos, preferiblemente anticuerpos de llama de un solo dominio o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, y más preferiblemente un V<sub>H</sub>H. La secuencia de polinucleótido de los ácidos nucleicos que codifican para los anticuerpos producidos mediante el método de la presente invención deriva fácilmente de la secuencia del anticuerpo o V<sub>H</sub>H en cuestión por los expertos en la técnica. Dichos ácidos nucleicos pueden usarse para construir vectores de transformación y luego introducirse en una célula huésped mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, Nueva York, 1989).

También dentro del alcance de esta invención hay un método para reducir la carga bacteriana de *Escherichia coli* enterohemorrágica en ganado vacuno. El ganado vacuno y otros rumiantes son reservorios primarios para los serotipos de *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga (ECTS) asociados normalmente con el SUH humano, por ejemplo, O157:H7. Los terneros se infectan con ECTS al comienzo de su vida a través de la transmisión horizontal o vertical (Shaw, D. J., C. Jenkins, M. C. Pearce, T. Cheasty, G. J. Gunn, G. Dougan, H. R. Smith, M. E. Woolhouse y G. Frankel. 2004. Shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a Scottish beef farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7456-7465) y no desarrollan signos clínicos de infección, pero pueden eliminar las bacterias durante varios meses y en grandes cantidades (Widiasih, D. A., N. Ido, K. Omoe, S. Sugii y K. Shinagawa. 2004. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol. Infect.* 132:67-75).

La reducción de la eliminación persistente de ECTS en ganado vacuno contribuiría en gran medida a prevenir las infecciones humanas por ECTS. La evidencia de que la vacunación bovina puede ser una opción de control sensata proviene de estudios en los que el ganado vacuno elimina *E. coli* O157 con menos frecuencia tras la inmunización con antígenos de ECTS O157:H7 (Potter, A. A., S. Klashinsky, Y. Li, E. Frey, H. Townsend, D. Rogan, G. Erickson, S. Hinkley, T. Klopfenstein, R. A. Moxley, D. R. Smith y B. B. Finlay. 2004. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* 22: 362-369). La evidencia acumulada muestra que las toxinas Shiga suprimen la respuesta inmunitaria a antígenos de ECTS durante las infecciones. Stx altera el patrón de expresión de citocinas en macrófagos de la mucosa (Stamm, I., M. Mohr, PS Bridger, E. Schröpfer, M. König, WC Stoffregen, EA Dean-Nystrom, G. Baljer y C. Menge. 2008. Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Infect. Immun.* 76: 5381-5391) y linfocitos intraepiteliales (Menge, C., M. Blessenohl, T. Eisenberg, I. Stamm y G. Baljer. 2004. Bovine ileal intraepithelial lymphocytes represent target cells for Shiga toxin 1 from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 72: 1896-1905) y suprime la activación y proliferación de linfocitos de la mucosa y periféricos *in vitro* (Moussay, E., I. Stamm, A. Taubert, G. Baljer y C. Menge. 2006. *Escherichia coli* Shiga toxin 1 enhances IL-4 transcripts in bovine ileal intraepithelial lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113: 367-382). Además, el desarrollo de una respuesta inmunitaria celular adaptativa se retrasa significativamente tras la infección experimental de terneros con ECTS O157:H7 productora de Stx2 en comparación con la de los animales inoculados con *E. coli* O157:H7 negativa para Stx (Hoffman, M. A., C. Menge, T. A. Casey, W. Laegreid, B. T. Bosworth y E. A. Dean-Nystrom. 2006. Bovine immune response to Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Clin. Vaccine Immunol.* 13: 1322-1327).

Por tanto, aunque todavía se desconoce cómo las respuestas inmunitarias celulares específicas de *E. coli* O157:H7 afectan a la eliminación de ECTS a largo plazo e intermitente (Cray, W. C., Jr. y H. W. Moon. 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1586-1590), se ha sugerido que la inclusión de Stx como antígeno en formulaciones anti-ECTS para vacunas bovinas sería beneficiosa, porque es el único factor de virulencia compartido por todas las cepas de ECTS, y porque la neutralización de Stx podría mejorar la respuesta inmunitaria global frente a ECTS (Fröhlich J1, Baljer G, Menge C. Maternally and naturally acquired antibodies to Shiga toxins in a cohort of calves shedding Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* Junio de 2009; 75 (11):3695-704).

Además, los estudios realizados en modelos de ratón demostraron que los anticuerpos anti-Stx pueden inhibir la colonización de ECEH (Mohawk KL, Melton-Celsa AR, Robinson CM, O'Brien AD. Neutralizing antibodies to Shiga toxin type 2 (Stx2) reduce colonization of mice by Stx2-expressing *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine* 2010., 28: 4777-4785). Entre los diferentes mecanismos propuestos, se ha demostrado que Stx2 puede contribuir

positivamente a la adherencia de ECEH al mejorar la expresión en superficie de nucleolina, que sirve como receptor eucariota para la intimina (Sinclair JF, O'Brien AD. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Biol Chem 2002, 277: 2876-2885; Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103: 9667-9672).

En el método para reducir la carga bacteriana de *Escherichia coli* enterohemorrágica de la invención en mamíferos tales como ganado vacuno, el complejo oligomérico de la invención se administra al animal en el que se desea una reducción de la carga bacteriana, provocando así una respuesta inmunitaria eficaz frente a la subunidad B de la toxina Shiga 2. A su vez, esto previene la supresión por las toxinas Shiga de la respuesta inmunitaria frente a los antígenos de ECTS, lo que da como resultado una reducción de la eliminación persistente de ECTS en ganado vacuno.

En un método alternativo para reducir la carga bacteriana de *Escherichia coli* enterohemorrágica de la invención en mamíferos tales como ganado vacuno, el anticuerpo de la invención se administra al animal en el que se desea una reducción de la carga bacteriana.

#### EJEMPLO 1

##### Modelado molecular de la proteína quimérica BLS-Stx2

Se llevó a cabo el diseño de la quimera modelando su estructura teórica con el programa PyMOL 1.5 ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) fusionando el extremo C-terminal de la estructura de Stx2B (código PDB: IR4P) con el extremo N-terminal de la estructura cristalográfica de BLS (código PDB: IDI0), una estrategia similar a la descrita anteriormente por Laplagne *et al.* (Laplagne *et al.*, 2004. Proteins 57: 820-828). Se reemplazó la secuencia codificante de los primeros ocho residuos del extremo N-terminal de BLS por la secuencia codificante de Stx2B y un ligador peptídico G/S flexible, de pentapéptido, decaapéptido o uno de quince aminoácidos que conecta ambas proteínas. Tanto Stx2B como BLS forman estructuras pentaméricas de la misma simetría C5 en las que cada protómero interacciona con otros dos. La estructura teórica de las quimeras obtenidas mediante modelado molecular (figura 1) indica que todos los ligadores usados son lo suficientemente largos como para permitir el ensamblaje de los pentámeros Stx2B en los módulos pentaméricos de BLS sin ningún impedimento estérico. En la partícula de BLS decaamérica, dos pentámeros Stx2B se presentarían en sentidos opuestos en la parte superior e inferior de la estructura. Cabe señalar que, en este modelo, la superficie C-terminal de Stx2B, que interacciona con la subunidad A en la holotoxina Stx2, estaría enfrentada al armazón de BLS y podría estar protegida frente a la interacción con el sistema inmunitario, mientras que los sitios de unión a la globotriaosilceramida (Gb3) estarían totalmente expuestos.

#### EJEMPLO 2

Se construyó el plásmido pET11a-BLS-Stx2B-L5 (con el ligador de 5 aminoácidos) que contiene un gen con SEQ ID NO: 4, a través del siguiente protocolo:

a) Para clonar el gen codificante para la lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS), se obtuvo la secuencia de BLS mediante amplificación por PCR con cebadores específicos del ADN genómico de *B. abortus* y se clonó en el vector pET11a (Novagen, EE.UU.). Para desarrollar el casete, se realizó una mutagénesis dirigida sobre la secuencia codificante para el marco de lectura abierto de la lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS) (Laplagne *et al.* 2004). Se insertaron dos nuevos sitios de restricción en la región 5' del gen BLS: un sitio Nsil en los primeros dos codones del extremo 5' y un sitio AflII en los dos codones que comprenden los 8 y 9 residuos de la secuencia de aminoácidos nativa de BLS.

b) Para insertar la secuencia codificante para la proteína Stx2B (SEQ ID NO: 1), se diseñaron oligonucleótidos que amplifican la proteína Stx2B con el sitio de la enzima Nsil (subrayado) en el extremo 5' de la secuencia y el sitio de la enzima AflII (subrayado) en el extremo 3' de la secuencia más una secuencia que codifica para un ligador de cinco aminoácidos (en negrita). El gen Stx2B (SEQ ID NO: 2) se obtuvo mediante PCR a partir de una secuencia clonada previamente en el vector pGEM-T como molde (Capozzo *et al.*, 2003. Infect Immun 71:3971-3978).

Por tanto, se construyeron los siguientes oligonucleótidos para usarse como cebadores en la PCR:

Cebador directo (SEQ ID NO: 10):

5' ATCAACATGCATGCGGATTGTGCTAAAGGT 3'

Cebador inverso 5 (SEQ ID NO: 11):

5' TAAAATCTTAAG**ACCAGAACCAGA**ACCGTCATTATTAACACTGCAC 3'

Se llevó a cabo la reacción de PCR con desoxirribonucleótidos trifosfato 0,2 mM (dNTP) (Promega Inc.), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (PBL<sup>®</sup>), 0,15 unidades de ADN Taq polimerasa (PBL<sup>®</sup>) y cebadores 0,5 μM. El perfil de ciclos fue: 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 92°C durante 10 segundos, 62°C durante 12 segundos y 72°C durante 30 segundos y 1 ciclo final de 72°C durante 2 minutos.

Se verificó el producto de PCR usando geles de agarosa y luego se purificó usando el kit de extracción Qiagen (Qiagen, R.U.)

c) Se digirieron el plásmido pET11a-BLS y el producto de PCR Stx2B-L5 purificado con las enzimas de restricción Nsil y Afill. Se realizó la digestión con 3 unidades de Nsil (Fermentas Inc.) y 3 unidades de Afill (Fermentas Inc) en tampón Tango™ 2X (concentración final) durante 4 horas a 37°C. Se ligaron los productos digeridos con 5 unidades de enzima ADN ligasa de T4 (Fermentas Inc.) durante la noche a 16°C. Se transformó el ligamiento en células DH5α de *E. coli* competentes y se examinaron las colonias mediante PCR con cebadores específicos (directo e inverso 5). Se confirmó la inserción mediante secuenciación. El análisis de secuenciación mostró que los primeros 8 aminoácidos de la lumazina sintasa de *Brucella spp.* se reemplazaron por los 70 aminoácidos de la proteína Stx2B (SEQ ID NO: 1). Por tanto, se obtuvo un gen que codifica para una proteína de fusión quimérica denominada BLS-Stx2B (L5) con SEQ ID NO: 3.

### EJEMPLO 3

Se construyó el plásmido pCI-neo-BLS-Stx2B-L5 mediante el siguiente protocolo:

La secuencia del gen de BLS-Stx2B (L5) SEQ ID NO: 4 clonado en el vector pET11a se subclonó en el vector pCi-neo (Promega, EE.UU.). Por tanto, se construyeron los siguientes oligonucleótidos para usarse como cebadores en la PCR:

**ACCATG**  
BLS-DNA-chimera all (SEQ ID NO: 12): 5' **GTTTAAGAATT**CGAAGGAGAT**ACCACCATGCAT**  
 3'

BLS-Back (SEQ ID NO: 13): 3' **CGTAGCGCGAACAGACTCGATCGT**ACTGACCACCTGT 5'

El cebador BLS-DNA-chimera all añade un sitio de restricción para la enzima Eco RI (en negrita) y una secuencia consenso de Kozak (subrayado), y el cebador BLS-Back añade un sitio de restricción para la enzima NheI (en negrita).

Se amplificó tal secuencia mediante PCR usando el plásmido pET11a-BLS-Stx2B (L5) como molde. Se realizó la reacción de PCR tal como se describe en el ejemplo 2C. El perfil de ciclos fue: 1 ciclo de 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 74°C durante 1 minuto y 1 ciclo final de 74°C durante 8 minutos. Se digirió el producto de PCR con las enzimas EcoRI y NheI y se digirió el vector pCI-neo con EcoRI y XbaI. Se llevó a cabo la digestión con EcoRI/NheI de la siguiente manera: 5 unidades de NheI (Fermentas Inc.) en tampón Tango™ 1X (concentración final) durante 4 horas a 37°C. Luego, se añadieron 5 unidades de EcoRI (Fermentas Inc.) y tampón Tango™, según la fórmula  $V = A/8$ , donde V es el volumen de tampón que ha de añadirse y A es el volumen inicial de la reacción. Se incubó la digestión durante 3 horas más a 37°C. Se llevó a cabo la digestión con EcoRI/XbaI con 4 unidades de EcoRI y 4 unidades de XbaI (Fermentas Inc.) en tampón Tango™ 2X (concentración final) durante 4 horas a 37°C.

Luego se realizó una reacción de ligamiento (las enzimas NheI y XbaI tienen extremos compatibles) tal como se describió en el ejemplo 2C. Se transformó el ligamiento en células DH5α de *E. coli* competentes y se examinaron las colonias mediante PCR con cebadores específicos (BLS-DNA-chimera all/BLS-Back y directo/inverso 5). Se verificó el constructo obtenido mediante secuenciación. Se amplificó el plásmido pCI-neo-BLS-Stx2B (L5) en células DH5α de *E. coli* y se purificó adicionalmente mediante columnas "mini prep" (Qiagen, R.U.). Se evaluaron la pureza y concentración del ADN mediante espectrofotometría a 260/280 nm.

### EJEMPLO 4

Se construyó el plásmido pET11a-BLS-Stx2B-L10 (con el ligador de 10 aminoácidos) que contiene un gen con SEQ ID NO: 6, a través del siguiente protocolo:

a) Para clonar el gen codificante para la lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS), se obtuvo la secuencia de BLS mediante amplificación por PCR con cebadores específicos del ADN genómico de *B. abortus* y se clonó en el vector pET11a (Novagen, EE.UU.). Para desarrollar el casete, se realizó una mutagénesis dirigida sobre la secuencia codificante para el marco de lectura abierto de la lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS) (Laplagne *et al.*, 2004. Proteins 57: 820-828). Se insertaron dos nuevos sitios de restricción en la región 5' del gen BLS: un sitio Nsil en los

primeros dos codones del extremo 5' y un sitio Afill en los dos codones que comprenden los 8 y 9 residuos de la secuencia de aminoácidos nativa de BLS.

5 b) Para insertar la secuencia codificante para la proteína Stx2B (SEQ ID NO: 1), se diseñaron una secuencia que incluye las secuencias de nucleótidos que codifican para esta proteína Stx2B con el sitio de la enzima Nsil (subrayado) en el extremo 5' de la secuencia y el sitio de la enzima Afill (subrayado) en el extremo 3' de la secuencia más una secuencia que codifica para un ligador de diez aminoácidos (en negrita).

10 El gen Stx2B (SEQ ID NO: 2) se obtuvo mediante PCR a partir de una secuencia clonada previamente en el vector pGEM-T como molde (Capozzo *et al.*, 2003. Infect Immun 71:3971-3978).

Por tanto, se construyeron los siguientes oligonucleótidos para usarse como cebadores en la PCR:

15 Cebador directo (SEQ ID NO: 14):

5' ATCAACATGCATGCGGATTGTGCTAAAGGT 3'

Cebador inverso 10 (SEQ ID NO: 15):

20 5'TAAAATCTTAAG**AGAACCAGAACCAGAACCAGAACC**GATCATTATTA~~AACTGCAC~~  
3'

Se realizó la reacción de PCR tal como se describe en el ejemplo 2C. El perfil de ciclos fue: 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 92°C durante 10 segundos, 68°C durante 12 segundos y 72°C durante 30 segundos y 1 ciclo final de 72°C durante 2 minutos.

25 Se verificó el producto de PCR usando geles de agarosa y luego se purificó usando el kit de extracción Qiagen (Qiagen, R.U.).

30 c) Se digirieron el plásmido pET11a-BLS y el gen purificado con las enzimas de restricción Nsil y Afill y se ligaron con la enzima ADN ligasa de T4 a 16°C tal como se describe en el ejemplo 2 (C). Se transformó el ligamiento en células DH5α de *E. coli* competentes y se examinaron las colonias mediante PCR con cebadores específicos (directo e inverso 10). Se confirmó la inserción mediante secuenciación. El análisis de secuenciación mostró que los primeros 8 aminoácidos de la lumazina sintasa de *Brucella spp.* se reemplazaron por los 70 aminoácidos de la proteína Stx2B (SEQ ID NO: 1). Por tanto, se obtuvo un gen que codifica para una proteína de fusión quimérica denominada BLS-Stx2B (L10) con SEQ ID NO: 5.

#### EJEMPLO 5

40 Se construyó el plásmido pCI-neo-BLS-Stx2B-L10 mediante el siguiente protocolo:

La secuencia del gen de BLS-Stx2B (L10) SEQ ID NO: 6 clonado en el vector pET11a se subclonó en el vector pCi-neo (Promega, EE.UU.). Por tanto, se construyeron los siguientes oligonucleótidos para usarse como cebadores en la PCR:

45 BLS-DNA-chimera all (SEQ ID NO: 16): 5' GTTTAA **GAATTC**GAAGGAGATACCACCATGCAT  
3'

BLS-Back (SEQ ID NO: 17): 3'CGTAGCGCGAACAGACT**CGATCG**TACTGACCACCTGT 5'

50 El cebador BLS-DNA-chimera añade un sitio de restricción para la enzima Eco RI (en negrita) y una secuencia consenso de Kozak (subrayado), y el cebador BLS-Back añade un sitio de restricción para la enzima NheI (en negrita).

55 Se amplificó tal secuencia mediante PCR usando el plásmido pET11a-BLS-Stx2B (L10) como molde. Se llevó a cabo la PCR tal como se describe en el ejemplo 3. Se digirió el producto de PCR con las enzimas EcoRI y NheI y se digirió el vector pCi-neo con EcoRI y XbaI tal como se describe en el ejemplo 3. Luego se realizó una reacción de ligamiento (las enzimas NheI y XbaI tienen extremos compatibles) tal como se describe en el ejemplo 2 (C). Se transformó el ligamiento en células DH5α de *E. coli* competentes y se examinaron las colonias mediante PCR con cebadores específicos (BLS-DNA-chimera all/BLS-Back y directo/inverso 10). Se verificó el constructo obtenido mediante secuenciación. Se amplificó el plásmido pCi-neo-BLS-Stx2B (L10) en células DH5α de *E. coli* y se purificó adicionalmente mediante columnas "mini prep" (Qiagen, R.U.). Se evaluaron la pureza y concentración del ADN



mediante espectrofotometría a 260/280 nm.

EJEMPLO 6

5 Se construyó el plásmido pET11a-BLS-Stx2B (con el ligador de 15 aminoácidos) que contiene un gen con SEQ ID NO: 8 a través del siguiente protocolo:

10 a) Para clonar el gen codificante para la lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS), se obtuvo la secuencia de BLS mediante amplificación por PCR con cebadores específicos del ADN genómico de *B. abortus* y se clonó en el vector pET11a (Novagen, EE.UU.). Para desarrollar el casete, se realizó una mutagénesis dirigida sobre la secuencia codificante para el marco de lectura abierto de la lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS) (Laplagne *et al.*, 2004. Proteins 57: 820-828). Se insertaron dos nuevos sitios de restricción en la región 5' del gen BLS: un sitio Nsil en los primeros dos codones del extremo 5' y un sitio AflII en los dos codones que comprenden los 8 y 9 residuos de los aminoácidos nativos secuencia de BLS.

15 b) Para insertar la secuencia codificante para la proteína Stx2B (SEQ ID NO: 1), se diseñaron una secuencia que incluye las secuencias de nucleótidos que codifican para esta proteína Stx2B con el sitio de la enzima Nsil en el extremo 5' de la secuencia y el sitio de la enzima AflII en el extremo 3' de la secuencia más una secuencia que codifica para un ligador de quince aminoácidos (en negrita).

20 El gen Stx2B (SEQ ID NO: 2) se obtuvo mediante PCR a partir de una secuencia clonada previamente en el vector pGEM-T como molde (Capozzo *et al.*, 2003. Infect Immun 71:3971-3978).

25 Por tanto, se construyeron los siguientes oligonucleótidos para usarse como cebadores en la PCR:

Cebador directo (SEQ ID NO: 18):

5' ATCAACATGCATGCGGATTGTGCTAAAGGT 3'

30 Cebador inverso 15 (SEQ ID NO: 19):

5'TAAATCTTAAG**ACCAGAACCAGAACCAGAACCAGAACCAGAACCAG**  
**AACCGTCATTATTA**ACTGCAC 3'

35 Se realizó la reacción de PCR tal como se describe en el ejemplo 2C. El perfil de ciclos fue: 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 92°C durante 10 segundos, 68°C durante 12 segundos y 72°C durante 30 segundos y 1 ciclo final de 72°C durante 2 minutos.

40 Se verificó el producto de PCR usando geles de agarosa y luego se purificó usando el kit de extracción Qiagen (Qiagen, R.U.).

45 c) Se digirieron el plásmido pET11a-BLS y el gen purificado con las enzimas de restricción Nsil y AflII y se ligaron con la enzima ADN ligasa de T4 a 16°C, tal como se describe en el ejemplo 2 (C). Se transformó el ligamiento en células DH5α de *E. coli* competentes y se examinaron las colonias mediante PCR con cebadores específicos (directo e inverso 15). Se confirmó la inserción mediante secuenciación. El análisis de secuenciación mostró que los primeros 8 aminoácidos de la lumazina sintasa de *Brucella spp.* se reemplazaron por los 70 aminoácidos de la proteína Stx2B felina (SEQ ID NO: 1). Por tanto, se obtuvo un gen que codifica para una proteína de fusión química denominada BLS-Stx2B (L15) con SEQ ID NO: 7.

EJEMPLO 7

50 Se construyó el plásmido pCI-neo-BLS-Stx2B-L15, mediante el siguiente protocolo:

55 La secuencia del gen de BLS-Stx2B (L15) SEQ ID NO 8 clonado en el vector pET11a se subclonó en el vector pCi-neo (Promega, EE.UU.). Por tanto, se construyeron los siguientes oligonucleótidos para usarse como cebadores en la PCR:

BLS-DNA-chimera all (SEQ ID NO: 20):

5' GTTTAAGA**AATTCGAAGGAGATACCACCATGCAT** 3'

60 BLS-Back (SEQ ID NO: 21):

3 'CGTAGCGCGAACAGACT**CGATCG**TACTGACCACCTGT 5'

5 El cebador BLS-DNA-chimera añade un sitio de restricción para la enzima Eco RI (en negrita) y una secuencia consenso de Kozak (subrayado), y el cebador BLS-Back añade un sitio de restricción para la enzima NheI (en negrita).

10 Se amplificó tal secuencia mediante PCR usando el plásmido pET11a-BLS-Stx2B (L15) como molde. Se llevó a cabo la PCR tal como se describe en el ejemplo 3. Se digirió el producto de PCR con las enzimas EcoRI y NheI y se digirió el vector pCI-neo con EcoRI y XbaI tal como se describe en el ejemplo 3. Luego se realizó una reacción de ligamiento (las enzimas NheI y XbaI tienen extremos compatibles) tal como se describe en el ejemplo 2 (C). Se transformó el ligamiento en células DH5 $\alpha$  de *E. coli* competentes y se examinaron las colonias mediante PCR con cebadores específicos (BLS-DNA-chimera all/BLS-Back y directo/inverso 15). Se verificó el constructo obtenido mediante secuenciación. Se amplificó el plásmido pCI-neo-BLS-Stx2B (L15) en células DH5 $\alpha$  de *E. coli* y se purificó adicionalmente mediante columnas "mini prep" (Qiagen, R.U.). Se evaluaron la pureza y concentración del ADN mediante espectrofotometría a 260/280 nm.

#### EJEMPLO 8

##### Purificación de las quimeras BLS-Stx2B (con el ligador de 5, 10 y 15 aminoácidos).

20 Se transformaron los tres plásmidos pet11a-BLS-Stx2B en células BL21 (DE3) de *E. coli* competentes para la expresión de la proteína recombinante. Se hicieron crecer las células en caldo LB complementado con ampicilina, a 37°C con agitación (250 rpm). Se diluyeron los cultivos durante la noche 1:100 con nuevos medios de LB-ampicilina y se hicieron crecer para alcanzar una DO<sub>600nm</sub> = 1. En este punto, se indujo el cultivo mediante la adición de  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) 1 mM (Sigma) y se incubó durante 3 h a 28°C con agitación (250 rpm). Se centrifugaron las bacterias a 15.000 g durante 20 min a 4°C. Se resuspendieron las células recogidas en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se lisaron mediante sonicación.

30 Todas las quimeras Stx2B-BLS se expresaron como cuerpos de inclusión (figura 2A). Se solubilizaron los cuerpos de inclusión mediante incubación durante la noche en tampón de urea 8 M, Tris/HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8 a temperatura ambiente con agitación. Se dializaron las proteínas frente a tampones de urea 1 M, Tris/HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,5 con una membrana de MWCO de 12-14.000 (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, EE.UU.). Las proteínas solubilizadas se purificaron mediante cromatografía de intercambio aniónico en una columna Q-Sepharose (Pharmacia, GE Healthcare Life Sciences) usando un aparato de HPLC (Gilson modelo 320) conectado a un detector UV/vis (Gilson, modelo 152). Se realizó la elución usando un gradiente lineal entre NaCl 0 y 1 M en un tampón de urea 1 M, Tris/HCl 50 mM, PMSF 1 mM, pH 8,5. Se concentró la proteína con un sistema de concentración Centriprep® de MWCO de 10.000 (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda). Se determinó la pureza de las preparaciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio SDS-PAGE (al 15%, p/v) (figuras 2B y D) y se cuantificaron mediante métodos convencionales. Se dializó la proteína frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de cada inmunización. Las proteínas tenían el peso molecular esperado según lo determinado mediante SDS-PAGE (figura 2D) y las reconocieron anticuerpos anti-BLS y anti-Stx2 mediante ensayo de inmunotransferencia de tipo Western (figura 2C).

#### EJEMPLO 9

##### Transfección de células 293T con pCIneo-BLS-Stx2B L5, L10 y L15.

50 Para corroborar la expresión correcta de BLS-Stx2B dentro de células eucariotas, se transfectaron células 293T con pCI-BLS-Stx2B usando el reactivo PolyFect® (Qiagen Inc.). En resumen, se hicieron crecer  $6 \times 10^5$  células/pocillo en medio RPMI 1640 con antibiótico-antimicótico (AA) y suero bovino fetal al 5% (FBS, Natocor) en placas de cultivo de seis pocillos a 37°C en el 5% de CO<sub>2</sub>. Se diluyeron dos  $\mu$ g de pCIneo-BLS-Stx2B hasta 100  $\mu$ l con medio RPMI y se añadieron 20  $\mu$ l de reactivo PolyFect®. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos. Se diluyó la mezcla de transfección hasta 1 ml con medio RPMI, se añadió a las células y se incubó durante 48 h en medio RPMI 1640 con AA y FBS al 2% a 37°C en el 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 48 horas, se recogieron las células con PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. Se resuspendió el sedimento celular en tampón de muestra para SDS-PAGE (para lisis celular) y se sometió a análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western. El resultado de las proteínas de lisis celular se sometió a SDS-PAGE al 15% y se electrotransfirió a la membrana de nitrocelulosa. Se bloquearon las membranas con leche al 5% diluida en PBS – Tween al 0,1% durante 2 h a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos específicos de BLS diluidos (1:2.000) en leche al 3%, PBS - Tween al 0,1% durante la noche a 4°C. Se lavaron las membranas y se incubaron con IgG de conejo anti-ratón conjugada con peroxidasa (1:3.000) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) durante 2 h a temperatura ambiente. Se desarrolló la reacción con disolución de ECL (figura 3).

65 La figura 3 muestra que los tres constructos de pCIneo-BLS-Stx2B fueron capaces de expresar la proteína correspondiente en la línea celular eucariota 293T, revelada como una banda específica del peso molecular

esperado (aproximadamente 25 kDa) en el ensayo de inmunotransferencia de tipo Western.

#### EJEMPLO 10

##### 5 Análisis estructural mediante dicroísmo circular.

Para evaluar la estructura secundaria de las quimeras purificadas, se midió la señal de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano (intervalo de longitud de onda de 200-250 nm).

10 Se midieron los espectros de DC de BLS-Stx2B, BLS y Stx2B en la región de UV lejano (250-200 nm) en un espectropolarímetro J-810 de JASCO, en tampón PBS, pH 7,0 a 25°C, usando cubetas de cuarzo de o bien 1 o bien 2 mm de camino óptico. Los datos se convirtieron a elipticidad molar  $[\theta]$  (en unidades de  $^{\circ}\text{cm}^2 \mu\text{mol}_{\text{prot}}^{-1}$ ) usando el valor de peso molecular teórico obtenido para cada proteína usando las herramientas ProtParamExpASY (<http://web.expasy.org/protparam/>).

15 Se demostró que el espectro de UV lejano-DC de BLS-Stx2B es prácticamente idéntico al calculado teóricamente para esta proteína a partir de la combinación de las señales de DC de BLS y Stx2B aisladas. Estos resultados indican la conservación de la estructura secundaria tanto de BLS como de Stx2B en la estructura de las tres quimeras (figura 4).

#### 20 EJEMPLO 11

##### Análisis estructural mediante dispersión estática de luz

25 El peso molecular promedio ( $M_w$ ) de BLS-Stx2B se determinó en un instrumento de dispersión de luz PD2010 de Precision Detectors conectado en tándem a un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución que incluye un detector UV 486 de Waters y un refractómetro diferencial 2142 de LKB. En general, se cargaron 200-400  $\mu\text{l}$  de cada BLS-Stx2B L5, L10 y L15 (0,5-1 mg/ml) en una columna Superdex 200 HR-10/30, y se eluyeron con tampón de Tris/HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 8, urea 1 M. Se registraron las señales de índice de refracción y dispersión de luz a 90° del material de elución en un ordenador PC y se analizaron con el software Discovery32 suministrado por Precision Detectors. Se calibró el detector de dispersión de luz a 90° usando albúmina sérica bovina ( $M_w$ : 66,5 kDa) como estándar. La similitud entre el PM resultante y el PM teórico indicó el plegado apropiado en la estructura de cada quimera según la estructura cuaternaria de BLS nativa (figura 5).

#### 35 EJEMPLO 12

##### Análisis de desnaturalización térmica

40 Se siguió la desnaturalización inducida por calor de muestras de BLS-Stx2B L5, L10 y L15, BLS de tipo natural y Stx2B en tampones PBS, pH 7,0 midiendo la señal de DC a 222 nm de estas proteínas en un espectropolarímetro J-810 de JASCO en función de la temperatura. Se calentaron las muestras lentamente aumentando la temperatura con un sistema Peltier (Jasco). El intervalo de barrido de temperatura fue de 25-100°C a una velocidad de 4°C/min. Se midió la elipticidad molar a 222 nm cada 0,5°C. Así, el punto medio de temperatura de la transición térmica se consideró como una temperatura de fusión aparente ( $T_f$ ). La estructura plegada adecuada de las quimeras también estuvo respaldada por el análisis de la estabilidad térmica en comparación con los módulos de STX2B y BLS aislados. Se analizó la desnaturalización térmica de estas proteínas mediante espectroscopía de DC (figura 6). La estructura de BLS es estable hasta 85°C. Por encima de esta temperatura, la proteína se despliega de manera cooperativa en un proceso irreversible con una  $T_f$  aparente de 89°C. Por otro lado, Stx2B permanece estable hasta 50°C y luego se despliega de manera cooperativa e irreversible con una  $T_f$  aparente de 60°C.

50 En cambio, todas las quimeras BLS-Stx2B permanecen estables hasta 85°C y por encima de esta temperatura, la proteína se despliega en un proceso complejo. La señal de DC de las quimeras disminuye presumiblemente debido a un fenómeno de agregación de los dominios de STX2B desnaturalizados en la estructura decamérica de la quimera que perturban la estructura de los módulos de BLS que fomentan su despliegue. Sin embargo, la pérdida de la transición térmica de STXB a 60°C que se muestra en las tres quimeras indica que la molécula de BLS estabiliza la subunidad de la toxina B tipo Shiga retrasando la desnaturalización del pentámero hasta 83°C.

#### EJEMPLO 13

##### 60 Ensayo de unión a GB<sub>3</sub>

Dado que se requiere la conformación pentamérica de Stx2B para la unión a GB<sub>3</sub>, se usó un ensayo ELISA de unión a Gb<sub>3</sub> para confirmar funcionalmente que las versiones de la proteína quimérica con ligadores peptídicos de 5, 10 ó 15 aminoácidos de longitud (BLS-Stx2B-L5, BLS-Stx2B-L10 y BLS-Stx2B-L15, respectivamente) se ensamblaban para dar la configuración de la subunidad B de holotoxina nativa. El ensayo se realizó tal como se describió previamente (Akenazi *et al.*, 1989. J. ClinMicrobiol 27:1145-1150). Se usó Gb<sub>3</sub> (Matreya, State College, PA) disuelta

65

en cloroformo: metanol (2:1) para recubrir placas ELISA de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) a 1 µg por pocillo. Se usaron reservas de sueros de ratones inmunizados con BLS-Stx2B como anticuerpo primario (diluido 1:1.000), y se usó IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa (Zymed, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) como anticuerpo secundario (dilución 1:3.000). Se desarrolló la reacción con O-fenilendiamina (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) y se leyó la absorbancia a 492 nm. Se usaron extractos de BLS y BL21 de *E. coli* como controles negativos para la unión inespecífica.

Se observó una reacción positiva de modo dependiente de la dosis para las quimeras y la holotoxina Stx2 recombinante, pero no para BLS (figura 7). A partir de estos hallazgos, se concluye que las subunidades B en la parte superior del decámero de BLS están correctamente ensambladas y mantienen su capacidad de unión a Gb3 en las tres versiones de la proteína quimérica.

#### EJEMPLO 14

##### Transcurso temporal de los títulos de anticuerpos durante la inmunización.

Para evaluar la capacidad de BLS-Stx2B para mejorar la respuesta inmunitaria humoral en comparación con la subunidad Stx2B purificada recombinante aislada (Stx2B), se les inyectó a grupos de ratones por vía i.p. la quimera que tiene un péptido ligador G/S de 10 aminoácidos de longitud (BLS-Stx2B-L10) o Stx2B en presencia de adyuvante de Freund (FA). Se mezcló una suspensión de gel de hidróxido de aluminio (AH) (1 mg/ml) con Stx2B-BLS y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Se centrifugó el antígeno adsorbido en AH durante 10 min a 10.000 g y se resuspendió el sedimento en PBS.

Se analizó el anticuerpo de IgG específica en suero de ratones vacunados durante más de dos meses. Se provocaron títulos de IgG específicas para Stx2B en ambos grupos vacunados (figura 8A). Los títulos de ELISA del grupo de BLS-Stx2B-L10 aumentaron durante las primeras tres vacunaciones y alcanzaron su punto máximo a los 14 días después de la tercera vacunación. Mientras tanto, los ratones inmunizados con Stx2B no mostraron una respuesta de anticuerpos específica antes de 45 días después de la tercera dosis de vacunación, con una alta variabilidad de título entre individuos. En todos los momentos analizados, el título de anticuerpos generado por BLS-Stx2B-L10 fue significativamente mayor que el del grupo de Stx2B ( $P < 0,005$ ) (figura 8A).

También para evaluar la capacidad de BLS-Stx2B para estimular el sistema inmunitario y generar anticuerpos con diferentes formulaciones o regímenes de vacuna, se inmunizaron grupos de ratones con proteína BLS-Stx2B-L10 con adyuvante de Freund (FA) o hidróxido de aluminio (AH), sin ningún tipo de adyuvante, o siguiendo un programa de sensibilización-refuerzo de ADN-proteína. Se recogieron muestras de suero en diferentes momentos después de la vacunación y se determinaron los títulos de IgG específicas mediante ELISA. Los resultados indican que la quimera BLS-Stx2B estimula la respuesta inmunitaria en todos los protocolos sometidos a prueba, incluso sin ningún adyuvante exógeno (figura 8B). Por otro lado, el régimen de sensibilización-refuerzo de ADN-proteína indujo anticuerpos específicos de Stx2B últimamente (35 días después del refuerzo de proteína), pero en este punto de tiempo alcanzó el mismo título que BLS-Stx2B-L10 con AH. La proteína en ausencia de adyuvante indujo la respuesta humoral más baja, en términos de títulos máximos y tiempo para alcanzarlos.

Se inmunizaron ratones BALB/c adultos con 3 dosis de BLS-Stx2B-L10, con adyuvante de Freund (FA) (intraperitoneal, i.p.); AH (subcutánea, s.c.) o sin adyuvante (NA) (i.p.) en los días 0, 15 y 30. En el caso de FA, se administró la primera dosis con FA completo, la segunda dosis con FA incompleto y la última dosis sin adyuvante. Para AH, se mezcló una suspensión de 1 mg/ml con BLS-Stx2B-L10 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se centrifugó el antígeno adsorbido en AH durante 10 min a 10.000 g, se resuspendió el sedimento en PBS y se inoculó en ratones. También se inmunizaron grupos de ratones por vía i.p. con BLS y Stx2B en FA. Las dosis de BLS y BLS-Stx2B-L10 se corrigieron según sus pesos moleculares para inocular cantidades equimolares de cada proteína en comparación con la de Stx2B (la dosis era equivalente a 20 µg de Stx2B).

Para la inmunización de sensibilización-refuerzo, se les inyectó a los ratones 100 µg de pCl-BLS-Stx2B-L10 en los días 0, 14 y 28 por vía intramuscular (i.m.) en las patas traseras, seguido de un refuerzo final i.p. realizado con BLS-Stx2B-L10 en FA incompleto en el día 40.

Se anestesiaron los ratones, se les extrajo sangre mediante punción del plexo retroorbitario antes de cada inmunización y cada 15 ó 30 días para obtener muestras de suero.

Se analizó la IgG específica de Stx2B en muestras de suero de ratones vacunados mediante un ensayo ELISA. Brevemente, se recubrieron placas MaxiSorp de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) con 0,5 µg de Stx2B purificada y se bloquearon con BSA al 0,4% PBS-Tween al 0,05% durante 2 h a 37°C. Luego, se incubaron las placas durante 2 h a 37°C con sueros de ratón diluidos en serie. Después del lavado, se incubaron las placas con IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa (Zymed, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) diluida (1:3.000) en PBS-Tween 0,05% durante 1,5 h a 37°C. Se lavaron las placas y se desarrolló la reacción con O-fenilendiamina 2 mg/ml (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en tampón citrato/fosfato. Se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas de microtitulación ASYS UVM340 (Biochrom Ltd., Cambridge,

Inglaterra). Se expresaron los resultados como títulos de punto final, calculados como los valores inversos de la última dilución con una densidad óptica mayor que el medio de las muestras de suero preinmunitarias  $\pm 2$  x desviación estándar (DE).

5 EJEMPLO 15

Subtipado de anticuerpos y afinidad de anticuerpos

10 El antígeno BLS-Stx2B-L10 indujo mayores títulos de IgG1 específica anti-Stx2B que de IgG2a ( $P < 0,001$ ) para todos los protocolos analizados excepto en el programa de sensibilización-refuerzo, en el que no hubo diferencias significativas entre ambas subclases de IgG (figura 9). Para el subtipado de IgG, se llevó a cabo el ELISA tal como se describió anteriormente usando IgG1 e IgG2a de cabra anti-ratón conjugadas con peroxidasa (1:1.000) (BD-Pharmigen, New Jersey, EE.UU.) como anticuerpos secundarios.

15 Los sueros de ratones inmunizados como en el ejemplo 14 con BLS-Stx2B-L10 formulado con FA o AH, presentaron anticuerpos con mayor afinidad por Stx2B que los sueros de ratones inmunizados con Stx2B purificada en FA. Se observaron resultados de afinidad similares en sueros recogidos de ratones inmunizados con BLS-Stx2B-L10 sin adyuvante o en regímenes de sensibilización-refuerzo Tabla 1A. Las afinidades por Stx2B de los anticuerpos generados en ratones inmunizados se determinaron mediante ELISA basándose en la elución de tiocianato. El procedimiento fue similar al descrito para el ELISA de Stx2B, con la inclusión de una etapa adicional. Después de la incubación con concentraciones normalizadas de suero, se lavaron las placas y se añadió tiocianato de amonio (Anebra, San Fernando, Bs. As., Argentina), diluido en PBS, a los pocillos, en concentraciones que oscilaban desde 0 hasta 4 M. Se permitió que estuviesen en reposo las placas durante 15 min a temperatura ambiente antes de lavarse, y se continuó con el ensayo. Se determinó la concentración de tiocianato de amonio requerida para disociar el 50% del anticuerpo unido. Se calculó el porcentaje de unión de la siguiente manera:  $DO_{492nm}$  en presencia de tiocianato de amonio x  $100/DO_{492nm}$  en ausencia de tiocianato de amonio.

EJEMPLO 16

30 Títulos de neutralización contra Stx2 recombinante (rStx2)

Para determinar los títulos de anticuerpos neutralizantes de Stx2, se preincubaron  $1DC_{50}$  de rStx2 (670 pg de Stx2, dosis citotóxica que destruye el 50% de las células Vero) y diluciones en serie de las muestras de suero experimentales de ratones inmunizados como en el ejemplo 14, durante 1 h a 37°C seguido de 1 h a 4°C. Se recubrieron las mezclas en cada pocillo que contenía  $10^4$  células Vero y se incubaron durante 48 h a 37°C en el 5% de  $CO_2$ . Se lavaron las células con PBS, se tiñeron con colorante de violeta cristal y se leyeron en un lector de placas de microtitulación (Biochrom Ltd.) con un filtro de 570 nm. La actividad neutralizante se expresó como el valor inverso de la mayor dilución que bloqueó el 50% de la toxicidad de Stx2 para las células Vero.

40 Todos los sueros de ratones inmunizados con BLS-Stx2B-L10 formulado con FA mostraron el mayor título de neutralización ( $P < 0,001$ ). En cambio, los sueros de ratones inmunizados con Stx2B aislada, incluso cuando se formularon en FA, mostraron la menor actividad de neutralización (tabla 1).  
Tabla 1

	Título de neutralización	Afinidad de anticuerpos
BLS-Stx2B + FA	1508 $\pm$ 336 ***	0,87 $\pm$ 0,17 *
BLS-Stx2B + AH	178 $\pm$ 86	1,01 $\pm$ 0,11 *
BLS-Stx2B N/A	104 $\pm$ 66	0,52 $\pm$ 0,10
Sensibilización-refuerzo	203 $\pm$ 92	0,62 $\pm$ 0,14
Stx2B + FA	60 $\pm$ 48	0,41 $\pm$ 0,05

45 \*\*\* Significativamente diferente de otros grupos

\* Significativamente diferente del adyuvante Stx2B + Freund

50 *Tabla 1: Afinidad de antígenos y capacidad de neutralización de sueros de ratones inmunizados*

La afinidad por los anticuerpos se representó como las concentraciones molares de tiocianato de amonio requeridas para disociar el 50% de los anticuerpos unidos (en la prueba ELISA). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de 4-6 ratones/grupo.

55 Se preincubaron sueros de ratones inmunizados (45 días tras la última inmunización) *in vitro* con rStx2 y se sometió

a ensayo su toxicidad en células Vero tal como se detalla en Materiales y métodos. Cada valor representa la media  $\pm$  E.E.M. de 4-6 ratones/grupo.. \* P <0,05 frente a grupo de Stx2B + FA; \*\*\* P <0,001 frente a todos los demás protocolos de vacunación.

## 5 EJEMPLO 17

### Reactividad cruzada de sueros de ratón

10 Con este propósito, se incubaron sobrenadantes de cepas de ECEH aisladas en humanos que producen variantes de Stx2, Stx2c o Stx2d con sueros de ratones inmunizados con BLS-Stx2B-L10 + FA o Stx2B + FA, como en el ejemplo 14 y se evaluó la toxicidad en las células Vero. También se evaluó la capacidad de neutralización contra Stx1 recombinante (rStx1). Los sueros de ratones inmunizados con BLS-Stx2B-L10 neutralizaron fuertemente Stx2 de tipo natural y sus variantes, y también rStx1. En marcado contraste, solo la muestra de suero recogido de uno de cada seis ratones inmunizados con Stx2B purificada fue capaz de neutralizar débilmente Stx2 de tipo natural, y  
15 ninguno de ellos neutralizó variantes de Stx2 o rStx1 (Tabla 2).

Tabla 2

	BLS-Stx2B + FA	Stx2B + FA
Stx2	2461 $\pm$ 522	42 $\pm$ 42
Stx2c	1731 $\pm$ 346	0
Stx2d	1740 $\pm$ 386	0
Stx1	966 $\pm$ 486	0

20 *Tabla 2: Títulos de neutralización contra rStx1 purificada, Stx2 de tipo natural y sus variantes. Se incubaron in vitro sueros de ratones inmunizados con Stx2B o BLS-Stx2B-L10, ambos formulados con FA (45 días tras la última inmunización) con 1CD50 de cada Stx y se analizó la toxicidad en células Vero y se expresaron los resultados tal como se detalla en Materiales y métodos. Cada valor representa la media  $\pm$  E.E.M. de 6 ratones/grupo.*

## 25 EJEMPLO 18

### Protección de ratones inmunizados frente a la exposición a rStx2: actividad de neutralización de rStx2 ex vivo

30 Para el ensayo *ex vivo*, se preincubaron 2,2 ng/ratón de rStx2 (una dosis letal al 100%, 1DL<sub>100</sub>) con sueros de ratones inmunizados como en el ejemplo 14 durante 1 h a 37°C y 1 h a 4°C. Se inoculó la mezcla por vía intravenosa (i.v.) en ratones BALB/c adultos no tratados previamente y se observó la supervivencia. Esta dosis de rStx2 conduce a una mortalidad del 100% en el plazo de las 96 h posteriores a la inyección. Tal como se indica en la figura 10A, la preincubación de rStx2 con sueros recogidos de ratones inmunizados con BLS-Stx2B-L10 con diferentes protocolos, suprimió completamente la toxicidad de rStx2, mientras que los sueros de ratones vacunados con Stx2B no impidieron la toxicidad de rStx2.

## 35 EJEMPLO 19

### Exposición intravenosa a rStx2 y respuesta a largo plazo

40 Se expusieron ratones inmunizados como en el ejemplo 14 mediante inoculación i.v. con 1DL<sub>100</sub> de rStx2 50 días después de la última inmunización. La figura 10B muestra que el 100% de los ratones vacunados con BLS-Stx2B-L10 y el 33% de los ratones vacunados con Stx2B sobrevivieron a la exposición letal a rStx2. Según la dosis de rStx2 usada, el 0% de los animales inmunizados con BLS o ratones no inmunizados sobrevivieron a la exposición (figura 10B).

45 Se recogieron sueros de ratones inmunizados con BLS-Stx2B sobrevivientes a largo plazo para estudiar la duración de la respuesta de anticuerpos específicos (figura 11 A). Todos los regímenes de BLS-Stx2B indujeron una respuesta inmunitaria de larga duración evaluada como anticuerpos anti-Stx2 de ELISA. Se expusieron de nuevo los ratones a 2DL<sub>100</sub> (4,4 ng/ratón) de rStx2 ocho meses después de la última dosis y a 3 DL<sub>100</sub> (6,6 ng/ratón) 10  
50 meses después de la última dosis (figura 11B). Todos los ratones vacunados con BLS-Stx2B-L10 sobrevivieron a la exposición a 2DL<sub>100</sub> a los ocho meses después de la última dosis de inmunización, y a la exposición a 3 DL<sub>100</sub> a los 11 meses después de la última dosis de inmunización.

## 55 EJEMPLO 20

### Capacidad protectora de anticuerpos producidos mediante inmunización con una dosis de bls-stx2b-l10

Para analizar más a fondo la capacidad protectora de los anticuerpos producidos mediante inmunización con la proteína BLS-Stx2B-L10, se inmunizaron ratones BALB/c adultos con una dosis de BLS-Stx2B-L10 formulada en hidróxido de aluminio (la dosis era equivalente a 20 µg de Stx2B). Se mezcló una suspensión de gel de hidróxido de aluminio (AH) (1 mg/ml) con BLS-Stx2B-L10 y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Se centrifugó el antígeno adsorbido en AH durante 10 min a 10.000 g y se resuspendió el sedimento en PBS. Se recogieron muestras de suero en diferentes momentos después de la vacunación y se determinaron los títulos de IgG específicas mediante ELISA. Se analizó la IgG específica de Stx2B en muestras de suero de ratones vacunados mediante el ensayo ELISA tal como se describe en el ejemplo 14.

La figura 12 muestra que una dosis de BLS-Stx2B-L10 es suficiente para desarrollar una respuesta humoral de IgG específica.

Para someter a prueba la capacidad protectora de la respuesta inmunitaria, se expusieron los ratones a 1DL<sub>100</sub> de rStx2 un mes tras la inmunización. La figura 13A muestra que el 100% de los ratones vacunados con BLS-Stx2B-L10 sobrevivieron a la exposición letal a rStx2 mientras que el 0% de los ratones no inmunizados sobrevivieron a la exposición.

Se expusieron de nuevo los ratones supervivientes a 3DL<sub>100</sub> y 5DL<sub>100</sub> a los 2 meses tras la inmunización y 4 meses tras la inmunización, respectivamente. Las figuras 13B y C muestran que todos los ratones fueron capaces de sobrevivir a ambas exposiciones a altas dosis de rStx2, lo que indica la alta capacidad protectora de los anticuerpos producidos mediante inmunización con BLS-Stx2B-L10.

**Lista de secuencias**

- <110> INMUNOVA S.A. Spatz, Martin D. L.
- <120> QUIMERAS DE LUMAZINA SINTASA DE BRUCELLA Y SUBUNIDAD BETA DE TOXINAS AB5
- <130> 461-2611 PCT
- <150> Documento US 61/827713
- <151> 27-05-2013
- <160> 21
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 70
- <212> PRT
- <213> *Escherichia coli*
- <400> 1

```

Ala Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp
 1           5           10           15

Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Asp Gly Lys Glu Tyr Trp Thr Ser Arg
           20           25           30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
           35           40           45

Val Thr Ile Lys Ser Ser Thr Cys Glu Ser Gly Ser Gly Phe Ala Glu
 50           55           60

Val Gln Phe Asn Asn Asp
 65           70
    
```

50

ES 2 749 120 T3

<210> 2  
<211> 174  
5 <212> ADN  
<213> *Escherichia coli*  
<400> 2  
10           aaaattgagt tttccaagta taatgaggat gacacattta cagtgaaggt tgacgggaaa           60  
              gaatactgga ccagtcgctg gaatctgcaa ccgttactgc aaagtgctca gttgacagga           120  
              atgactgtca caatcaaata cagtacctgt gaatcaggct cgggatttgc taaa           174  
  
<210> 3  
15 <211> 228  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Constructo sintético  
25 <400> 3



ES 2 749 120 T3

Met His Ala Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn  
 1 5 10 15

Glu Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Asp Gly Lys Glu Tyr Trp Thr  
 20 25 30

Ser Arg Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly  
 35 40 45

Met Thr Val Thr Ile Lys Ser Ser Thr Cys Glu Ser Gly Ser Gly Phe  
 50 55 60

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

Ser Phe Lys Ile Ala Phe Ile Gln Ala Arg Trp His Ala Asp Ile Val  
 85 90 95

Asp Glu Ala Arg Lys Ser Phe Val Ala Glu Leu Ala Ala Lys Thr Gly  
 100 105 110

Gly Ser Val Glu Val Glu Ile Phe Asp Val Pro Gly Ala Tyr Glu Ile  
 115 120 125

Pro Leu His Ala Lys Thr Leu Ala Arg Thr Gly Arg Tyr Ala Ala Ile  
 130 135 140

Val Gly Ala Ala Phe Val Ile Asp Gly Gly Ile Tyr Arg His Asp Phe  
 145 150 155 160

Val Ala Thr Ala Val Ile Asn Gly Met Met Gln Val Gln Leu Glu Thr  
 165 170 175

Glu Val Pro Val Leu Ser Val Val Leu Thr Pro His His Phe His Glu  
 180 185 190

Ser Lys Glu His His Asp Phe Phe His Ala His Phe Lys Val Lys Gly  
 195 200 205

Val Glu Ala Ala His Ala Ala Leu Gln Ile Val Ser Glu Arg Ser Arg  
 210 215 220

Ile Ala Leu Val  
 225

<210> 4

5 <211> 687

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Constructo sintético

ES 2 749 120 T3

<400> 4

```

atgcatgctg attgtgctaa aggtaaaatt gagttttcca agtataatga ggatgacaca      60
tttacagtga aggttgacgg gaaagaatac tggaccagtc gctggaatct gcaaccgtta      120
ctgcaaagtg ctcagttgac aggaatgact gtcacaatca aatccagtac ctgtgaatca      180
ggctccggat ttgctgaagt gcagtttaat aatgacggtt ctggttctgg tcttaagaca      240
tcctttaaaa tcgcattcat tcaggcccgc tggcacgccg acatcgttga cgaagcgcgc      300
aaaagctttg tcgccgaact ggccgcaaag acgggtggca gcgtcgaggt agagatattc      360
gacgtgccgg gtgcatatga aattcccctt cacgccaaga cattggccag aaccgggcgc      420
tatgcagcca tcgtcgggtgc ggccttcgtg atcgacggcg gcatctatcg tcatgatttc      480
gtggcgacgg ccgttatcaa cggcatgatg caggtgcagc ttgaaacgga agtgccggtg      540
ctgagcgtcg tgctgacgcc gcaccatttc catgaaagca aggagcatca cgacttcttc      600
catgctcatt tcaaggtgaa gggcgtggaa gcggcccatg ccgccttgca gatcgtgagc      660
gagcgcagcc gcatcgcgct tgtctga      687
    
```

5 <210> 5

<211> 233

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Constructo sintético

<400> 5

```

Met His Ala Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn
 1           5           10           15

Glu Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Asp Gly Lys Glu Tyr Trp Thr
 20           25           30

Ser Arg Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly
 35           40           45

Met Thr Val Thr Ile Lys Ser Ser Thr Cys Glu Ser Gly Ser Gly Phe
 50           55           60

Ala Glu Val Gln Phe Asn Asn Asp Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 65           70           75           80
    
```

20

ES 2 749 120 T3

Gly Ser Leu Lys Thr Ser Phe Lys Ile Ala Phe Ile Gln Ala Arg Trp  
85 90 95

His Ala Asp Ile Val Asp Glu Ala Arg Lys Ser Phe Val Ala Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Lys Thr Gly Gly Ser Val Glu Val Glu Ile Phe Asp Val Pro  
115 120 125

Gly Ala Tyr Glu Ile Pro Leu His Ala Lys Thr Leu Ala Arg Thr Gly  
130 135 140

Arg Tyr Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Phe Val Ile Asp Gly Gly Ile  
145 150 155 160

Tyr Arg His Asp Phe Val Ala Thr Ala Val Ile Asn Gly Met Met Gln  
165 170 175

Val Gln Leu Glu Thr Glu Val Pro Val Leu Ser Val Val Leu Thr Pro  
180 185 190

His His Phe His Glu Ser Lys Glu His His Asp Phe Phe His Ala His  
195 200 205

Phe Lys Val Lys Gly Val Glu Ala Ala His Ala Ala Leu Gln Ile Val  
210 215 220

Ser Glu Arg Ser Arg Ile Ala Leu Val  
225 230

<210> 6

5 <211> 702

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Constructo sintético

15 <400> 6

atgcatgCGG attgtgctaa aggtaaaatt gagttttcca agtataatga ggatgacaca 60

tttacagtga aggttgacgG gaaagaatac tggaccagtc gctggaatct gcaaccgtta 120

ctgcaaagtG ctCagttgac aggaatgact gtcacaatca aatccagtac ctgtgaatca 180

ggctccggat ttgctgaagt gcagtttaat aatgacggtt ctggttctgg ttctggttct 240

ggttctctta agacatcctt taaaatcgca ttcattcagG cccgctggca cgccgacatc 300

gttgacgaag cgcgcaaaag ctttgtcgcc gaactggccG caaagacggg tggcagcgtc 360

ES 2 749 120 T3

gaggtagaga tattcgacgt gccgggtgca tatgaaattc cccttcacgc caagacattg 420  
 gccagaaccg ggcgctatgc agccatogtc ggtgcggcct tcgtgatcga cggcggcatc 480  
 tatcgtcatg atttcgtggc gacggccggt atcaacggca tgatgcaggt gcagcttgaa 540  
 acggaagtgc cgggtctgag cgctcgtgctg acgccgcacc atttccatga aagcaaggag 600  
 catcacgact tcttccatgc tcatttcaag gtgaagggcg tggaagcggc ccatgccgcc 660  
 ttgcagatcg tgagcgagcg cagccgcacg gcgcttgtct ga 702

<210> 7

5 <211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Constructo sintético

15 <400> 7

Met	His	Ala	Asp	Cys	Ala	Lys	Gly	Lys	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Asn
1				5					10					15	
Glu	Asp	Asp	Thr	Phe	Thr	Val	Lys	Val	Asp	Gly	Lys	Glu	Tyr	Trp	Thr
			20					25					30		
Ser	Arg	Trp	Asn	Leu	Gln	Pro	Leu	Leu	Gln	Ser	Ala	Gln	Leu	Thr	Gly
		35					40					45			
Met	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Ser	Ser	Thr	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	Gly	Phe
	50					55					60				
Ala	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Asn	Asp	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
65					70					75					80
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Lys	Thr	Ser	Phe	Lys	Ile	Ala	Phe
				85					90					95	
Ile	Gln	Ala	Arg	Trp	His	Ala	Asp	Ile	Val	Asp	Glu	Ala	Arg	Lys	Ser
			100					105					110		
Phe	Val	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Thr	Gly	Gly	Ser	Val	Glu	Val	Glu
		115					120					125			
Ile	Phe	Asp	Val	Pro	Gly	Ala	Tyr	Glu	Ile	Pro	Leu	His	Ala	Lys	Thr
	130					135					140				
Leu	Ala	Arg	Thr	Gly	Arg	Tyr	Ala	Ala	Ile	Val	Gly	Ala	Ala	Phe	Val
145					150					155					160

ES 2 749 120 T3

Ile Asp Gly Gly Ile Tyr Arg His Asp Phe Val Ala Thr Ala Val Ile  
 165 170 175

Asn Gly Met Met Gln Val Gln Leu Glu Thr Glu Val Pro Val Leu Ser  
 180 185 190

Val Val Leu Thr Pro His His Phe His Glu Ser Lys Glu His His Asp  
 195 200 205

Phe Phe His Ala His Phe Lys Val Lys Gly Val Glu Ala Ala His Ala  
 210 215 220

Ala Leu Gln Ile Val Ser Glu Arg Ser Arg Ile Ala Leu Val  
 225 230 235

<210> 8

5 <211> 717

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Constructo sintético

15 <400> 8

```

atgcatgctg attgtgctaa aggtaaaatt gagttttcca agtataatga ggatgacaca      60
tttacagtga aggttgacgg gaaagaatac tggaccagtc gctggaatct gcaaccgtta      120
ctgcaaagtg ctcagttgac aggaatgact gtcacaatca aatccagtac ctgtgaatca      180
ggctccggat ttgctgaagt gcagtttaaat aatgacgggtt ctggttctgg ttctggttct      240
ggttctgggt ctggttctgg tcttaagaca tcctttaaaa tcgcattcat tcaggcccgc      300
tggcacgccc acatcgttga cgaagcgcgc aaaagctttg tcgccgaact ggccgcaaag      360
acgggtggca gcgtcgaggt agagatattc gacgtgccgg gtgcatatga aattcccctt      420
cacgccaaga cattggccag aaccgggccc tatgcagcca tcgtcgggtgc ggccttcgtg      480
atcgacggcg gcatctatcg tcatgatttc gtggcgacgg ccgttatcaa cggcatgatg      540
caggtgcagc ttgaaacgga agtgccggtg ctgagcgtcg tgctgacgcc gcaccatttc      600
catgaaagca aggagcatca cgacttcttc catgctcatt tcaaggtgaa ggcgctggaa      660
gcggcccatg ccgccttgca gatcgtgagc gagcgcagcc gcatcgcgct tgtctga      717
    
```

<210> 9

20 <211> 158

<212> PRT

25 <213> Brucella abortus

<400> 9

Ala Ser Asn Gln Ser Cys Pro Asn Lys Thr Ser Phe Lys Ile Ala Phe  
 1 5 10 15

ES 2 749 120 T3

Ile Gln Ala Arg Trp His Ala Asp Ile Val Asp Glu Ala Arg Lys Ser  
 20 25 30

Phe Val Ala Glu Leu Ala Ala Lys Thr Gly Gly Ser Val Glu Val Glu  
 35 40 45

Ile Phe Asp Val Pro Gly Ala Tyr Glu Ile Pro Leu His Ala Lys Thr  
 50 55 60

Leu Ala Arg Thr Gly Arg Tyr Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Phe Val  
 65 70 75 80

Ile Asp Gly Gly Ile Tyr Arg His Asp Phe Val Ala Thr Ala Val Ile  
 85 90 95

Asn Gly Met Met Gln Val Gln Leu Glu Thr Glu Val Pro Val Leu Ser  
 100 105 110

Val Val Leu Thr Pro His His Phe His Glu Ser Lys Glu His His Asp  
 115 120 125

Phe Phe His Ala His Phe Lys Val Lys Gly Val Glu Ala Ala His Ala  
 130 135 140

Ala Leu Gln Ile Val Ser Glu Arg Ser Arg Ile Ala Leu Val  
 145 150 155

<210> 10

5 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador sintético

15 <400> 10

atcaacatgc atgCGgattg tgctaaaggt 30

<210> 11

20

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador sintético

30

<400> 11

taaaatctta agaccagaac cagaaccgctc attattaaac tgcac 45

35 <210> 12

<211> 33  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> Cebador sintético  
 <400> 12  
**gtttaagaat tcgaaggaga taccacatg cat** 33  
 15 <210> 13  
 <211> 37  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador sintético  
 <400> 13  
 30 **cgtagcgcga acagactcga tcgtactgac cacctgt** 37  
 <210> 14  
 <211> 30  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 14  
 45 **atcaacatgc atgcggattg tgctaaaggt** 30  
 <210> 15  
 50 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 60 <400> 15  
**taaaatcfta agagaaccag aaccagaacc agaaccagaa cgcgcattat taaactgcac** 60  
 <210> 16

	<211> 33	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador sintético	
	<400> 16	
	<b>gtttaagaat tcgaaggaga taccacatg cat</b>	<b>33</b>
15	<210> 17	
	<211> 37	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador sintético	
	<400> 17	
30	<b>cgtagcgcga acagactcga tcgtactgac cacctgt</b>	<b>37</b>
	<210> 18	
	<211> 30	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 18	
45	<b>atcaacatgc atgcggattg tgctaaaggt</b>	<b>30</b>
	<210> 19	
50	<211> 75	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador sintético	
60	<400> 19	
	<b>taaaatctta agaccagaac cagaaccaga accagaacca gaaccagaac cagaaccgtc</b>	<b>60</b>
	<b>attattaac tgcac</b>	<b>75</b>



<210> 20  
<211> 33  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
10 <223> Cebador sintético  
<400> 20  
15 **gtttaagaat tcgaaggaga taccacatg cat** 33  
<210> 21  
<211> 37  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
25 <220>  
<223> Cebador sintético  
<400> 21  
30 **cgtagcgcgga acagactcga tcgtactgac cacctgt** 37

**REIVINDICACIONES**

1. Proteína quimérica que comprende un péptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 95% con el monómero de una subunidad B de la toxina Shiga 2 de SEQ ID NO: 1, fusionándose dicho péptido a través de un ligador peptídico a un monómero de lumazina sintasa de *Brucella*, en la que el monómero de lumazina sintasa de *Brucella* tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 9; y el monómero de subunidad B de la toxina Shiga 2 se une al extremo N-terminal de dicho monómero de lumazina sintasa de *Brucella* por un ligador peptídico; y dicho ligador peptídico es un péptido flexible G/S; y dicho ligador peptídico tiene una longitud de entre 5 y 15 aminoácidos; y en la que dicha proteína quimérica forma un complejo oligomérico que comprende un dímero de pentámeros, en la que cada pentámero consiste en cinco monómeros idénticos y conserva la configuración nativa de los epítomos conformacionales de la subunidad B de la toxina Shiga 2 que constituyen los sitios de unión a la globotriaosilceramida (Gb3).
2. Proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que la proteína quimérica tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.
3. Complejo oligomérico proteico, que comprende un dímero de pentámeros de la proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
4. Polinucleótido que codifica para la proteína quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
5. Polinucleótido según la reivindicación 4. que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6.
6. Vector que comprende el polinucleótido según las reivindicaciones 4 ó 5.
7. Célula transgénica que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.
8. Célula transgénica según la reivindicación 7, en la que la célula es una célula BL21 (DE3) de *E. coli*.
9. Composición farmacéutica que comprende el complejo oligomérico proteico según la reivindicación 3 y/o el vector según la reivindicación 6, y un vehículo farmacéuticamente adecuado.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la composición farmacéutica es una vacuna.
11. Método de producción de la proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 o el complejo oligomérico proteico según la reivindicación 3, en el que dicho método comprende a) cultivar la célula transgénica según las reivindicaciones 7 u 8 en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína quimérica, y b) recuperar dicha proteína quimérica.
12. Uso del complejo oligomérico proteico según la reivindicación 3 en un método para producir un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad B de la toxina Shiga 2, comprendiendo dicho método las etapas de:
  - a) administrar a un mamífero no humano el complejo oligomérico proteico según la reivindicación 3 con un esquema de inmunización adecuado para provocar anticuerpos neutralizantes contra dicho complejo oligomérico,
  - b) obtener de dicho mamífero no humano una muestra biológica que contiene dichos anticuerpos neutralizantes y/o células capaces de producir dichos anticuerpos neutralizantes, y
  - c) usar dicha muestra biológica como fuente de dicho anticuerpo.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al complejo oligomérico proteico según la reivindicación 3.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, en el que la muestra biológica obtenida en la etapa b) comprende células B, que se usan en la etapa c) para producir un hibridoma.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el mamífero es un camélido.
16. Vacuna según la reivindicación 10, para su uso en un método de inducción de resistencia frente al síndrome urémico hemolítico (SUH) en un sujeto mamífero.

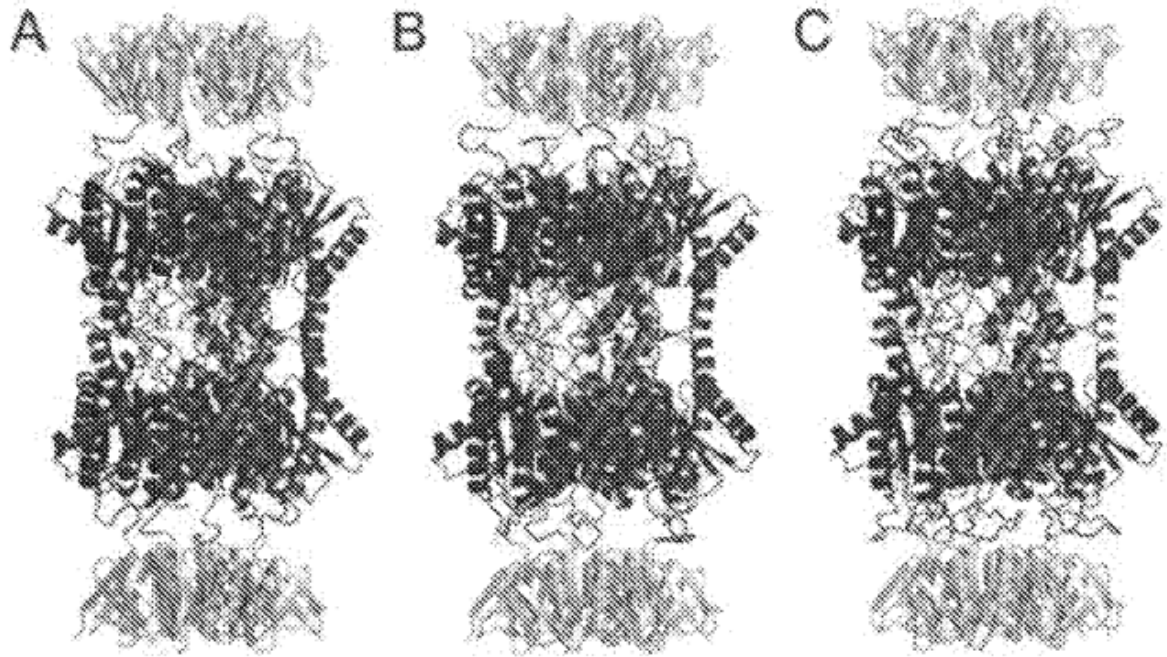


Figura 1

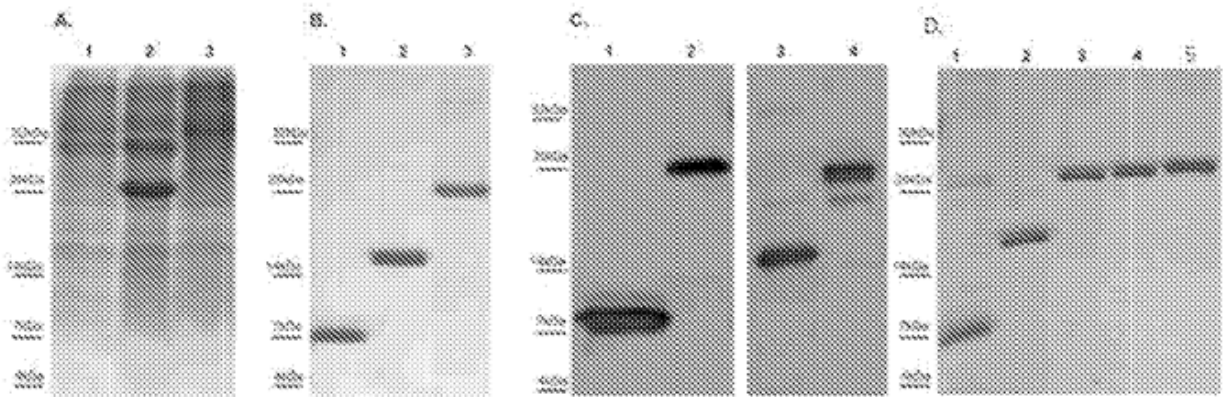
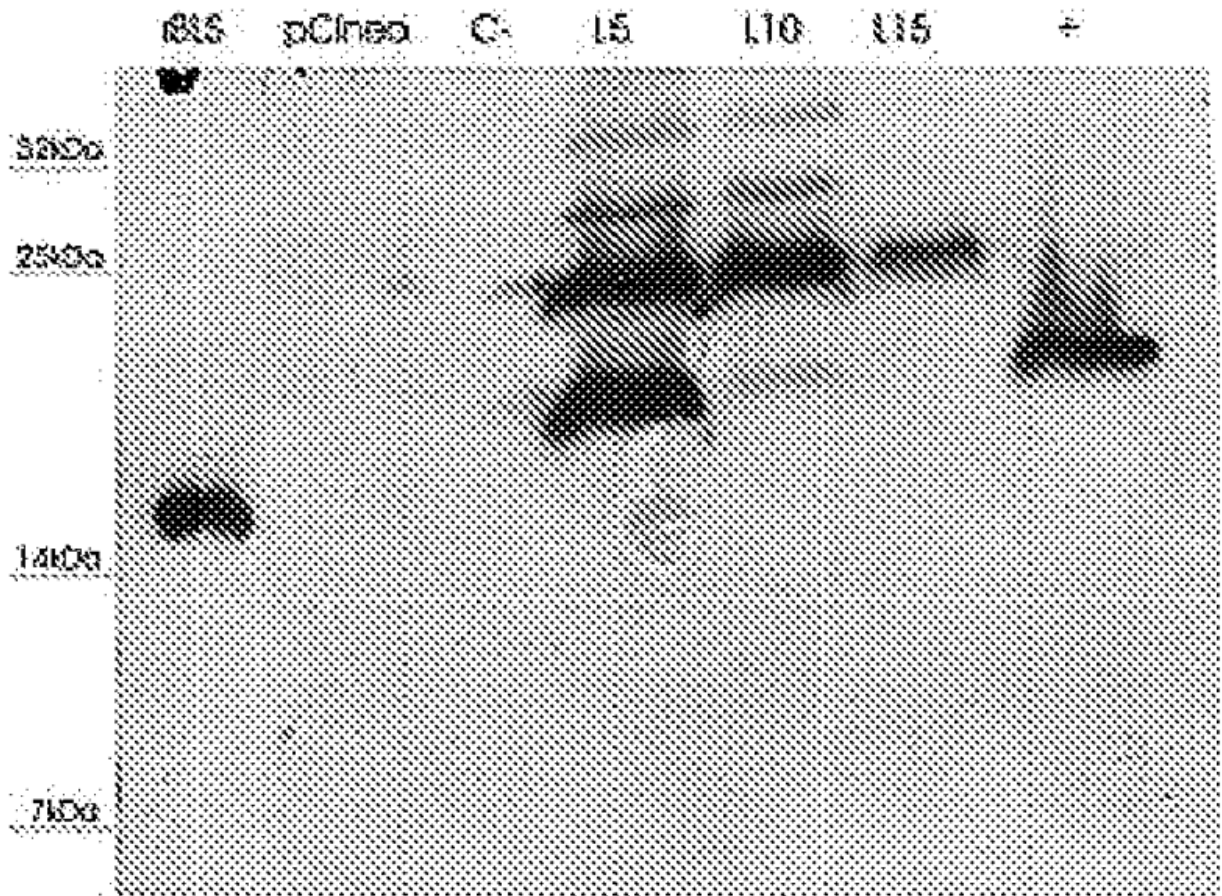


Figura 2



**Figura 3**

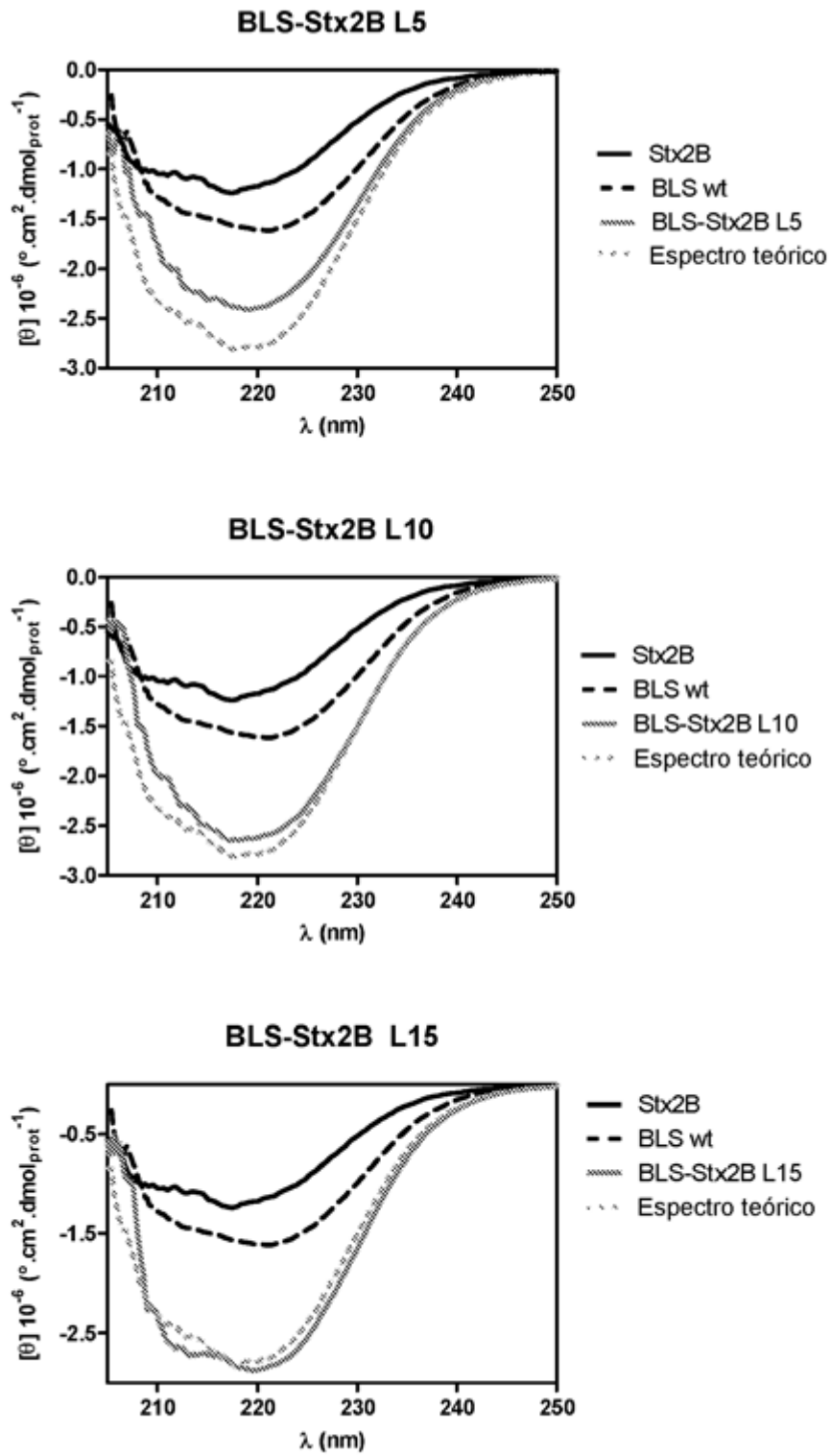


Figura 4

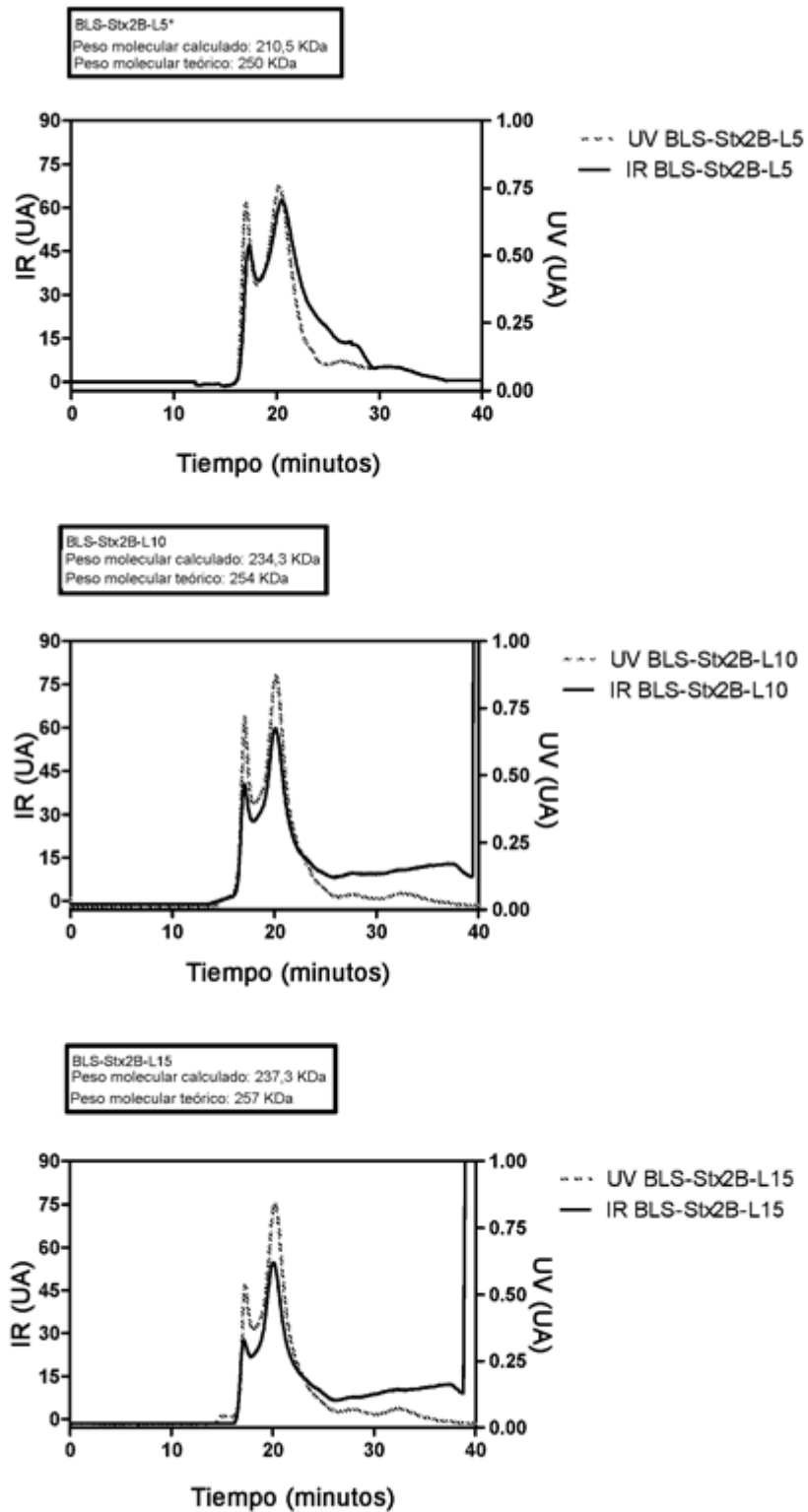


Figura 5

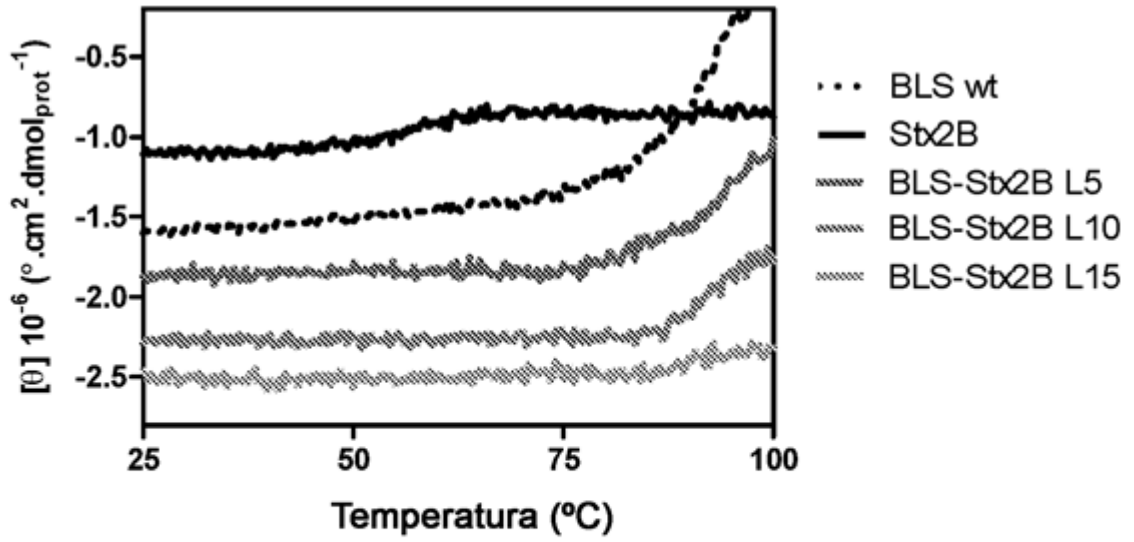


Figura 6

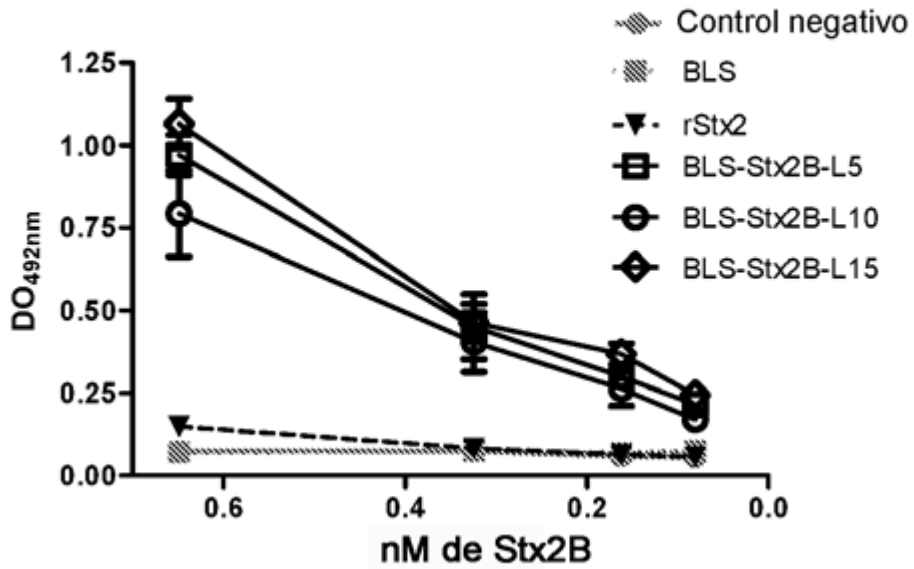


Figura 7

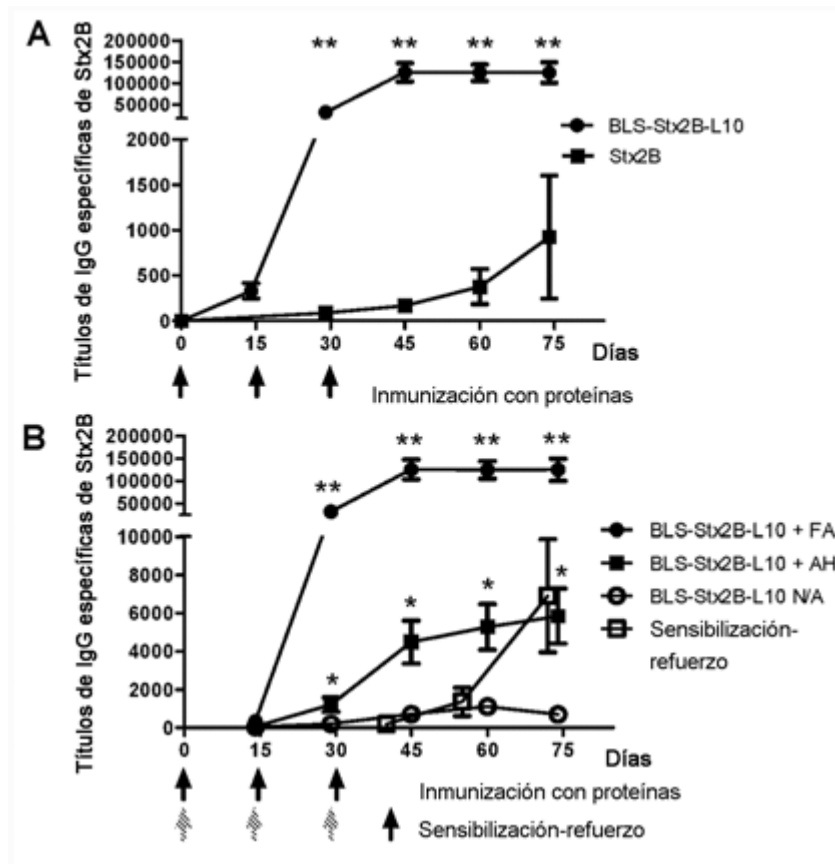


Figura 8

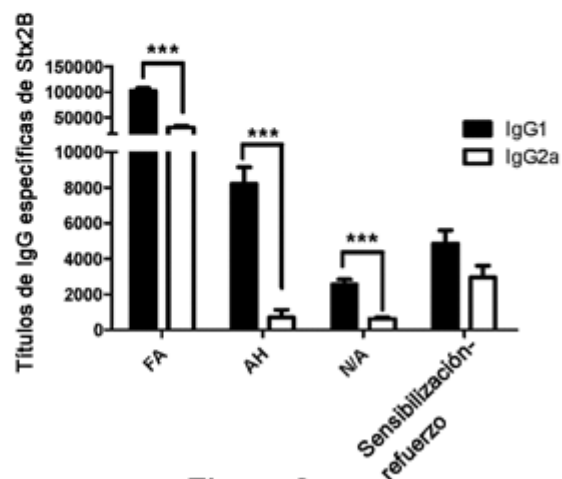


Figura 9



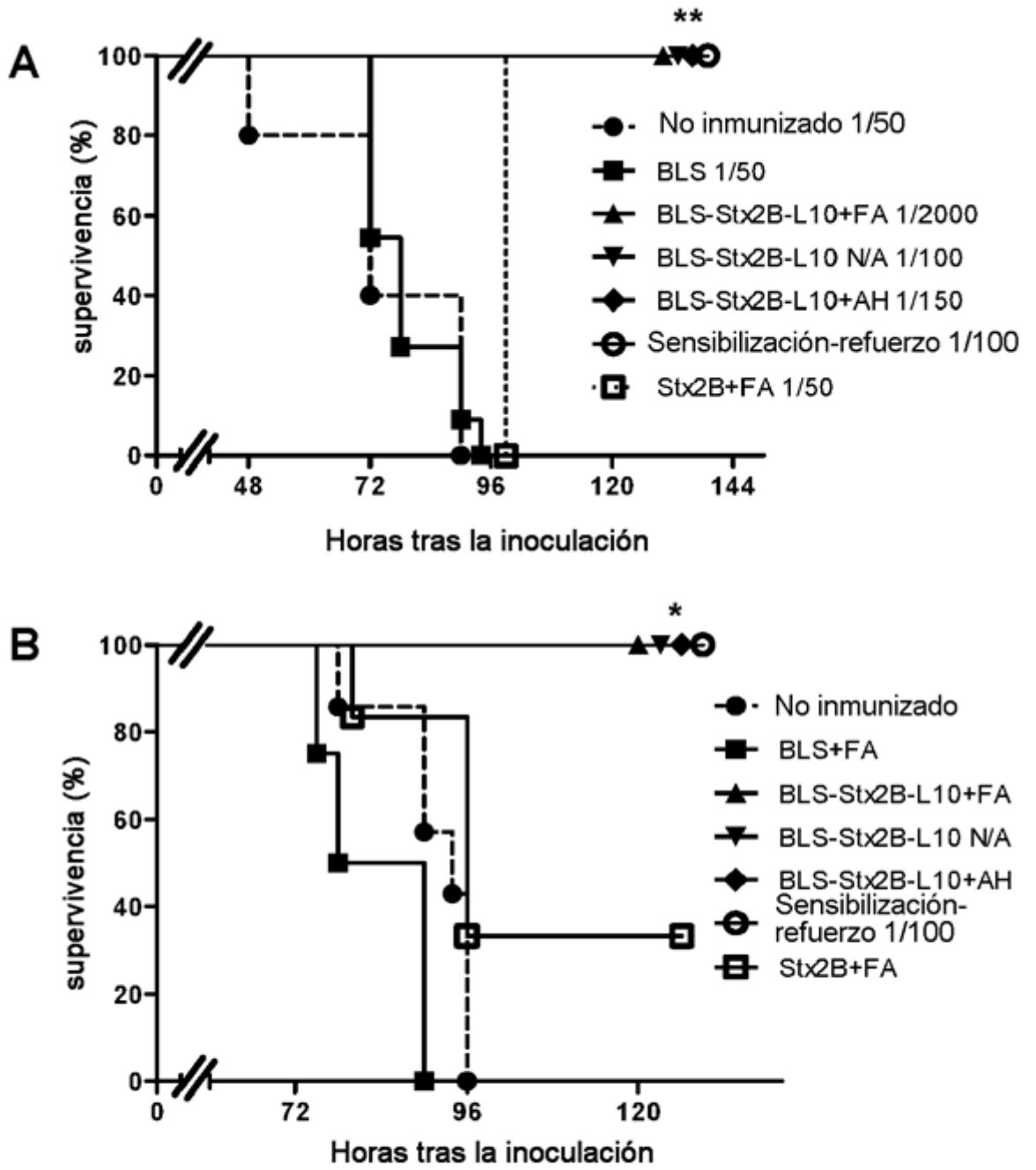


Figura 10

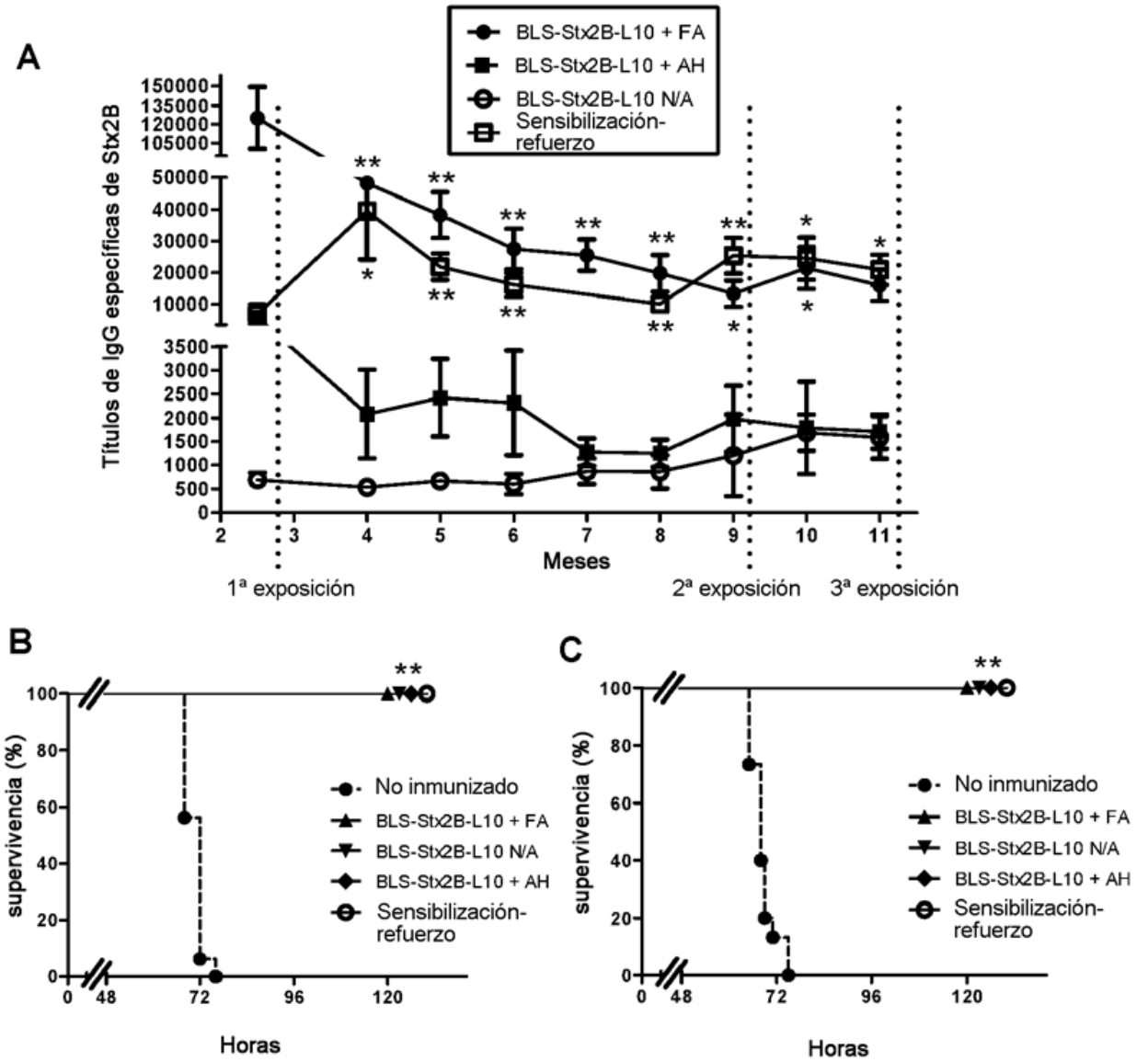


Figura 11

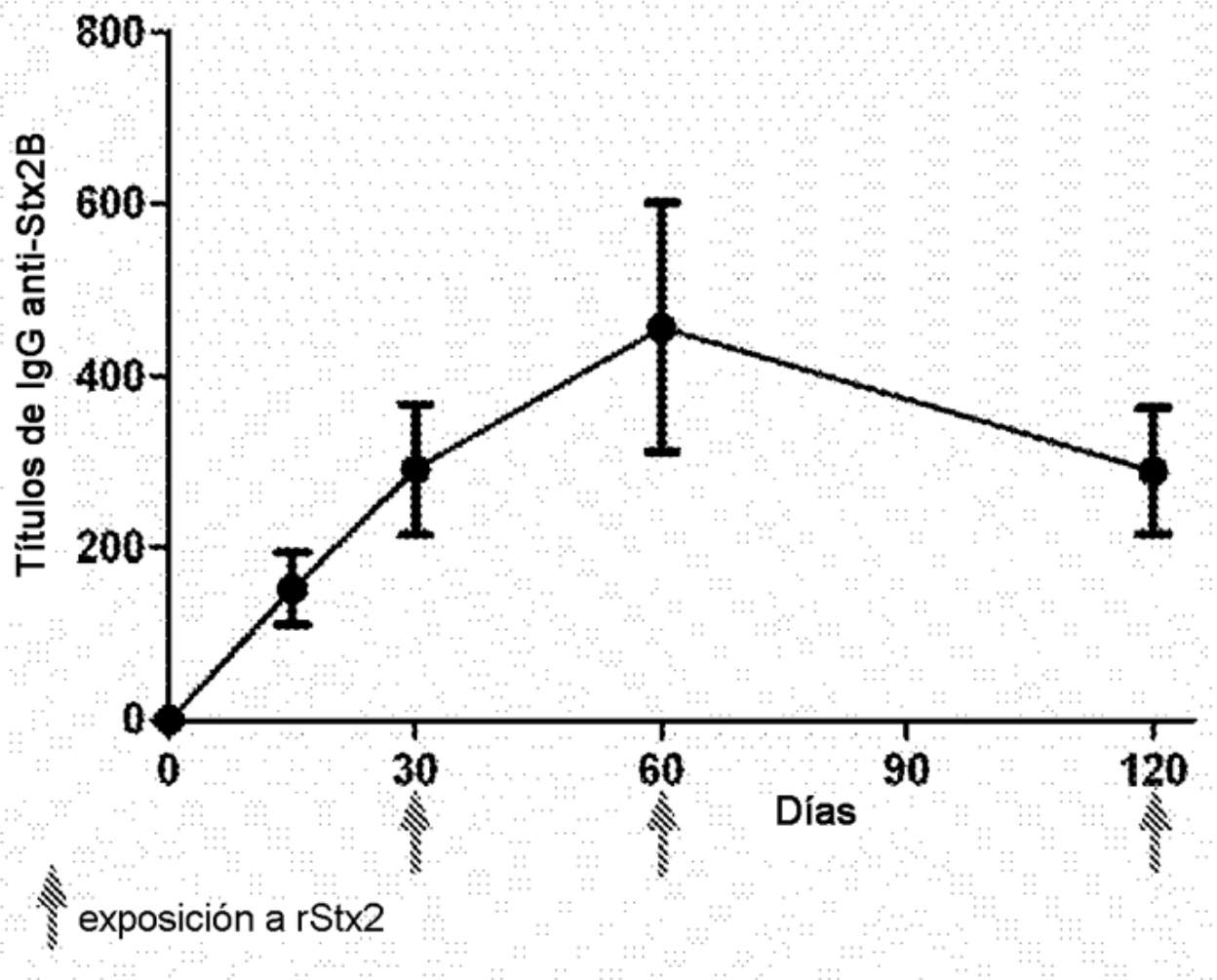


Figura 12

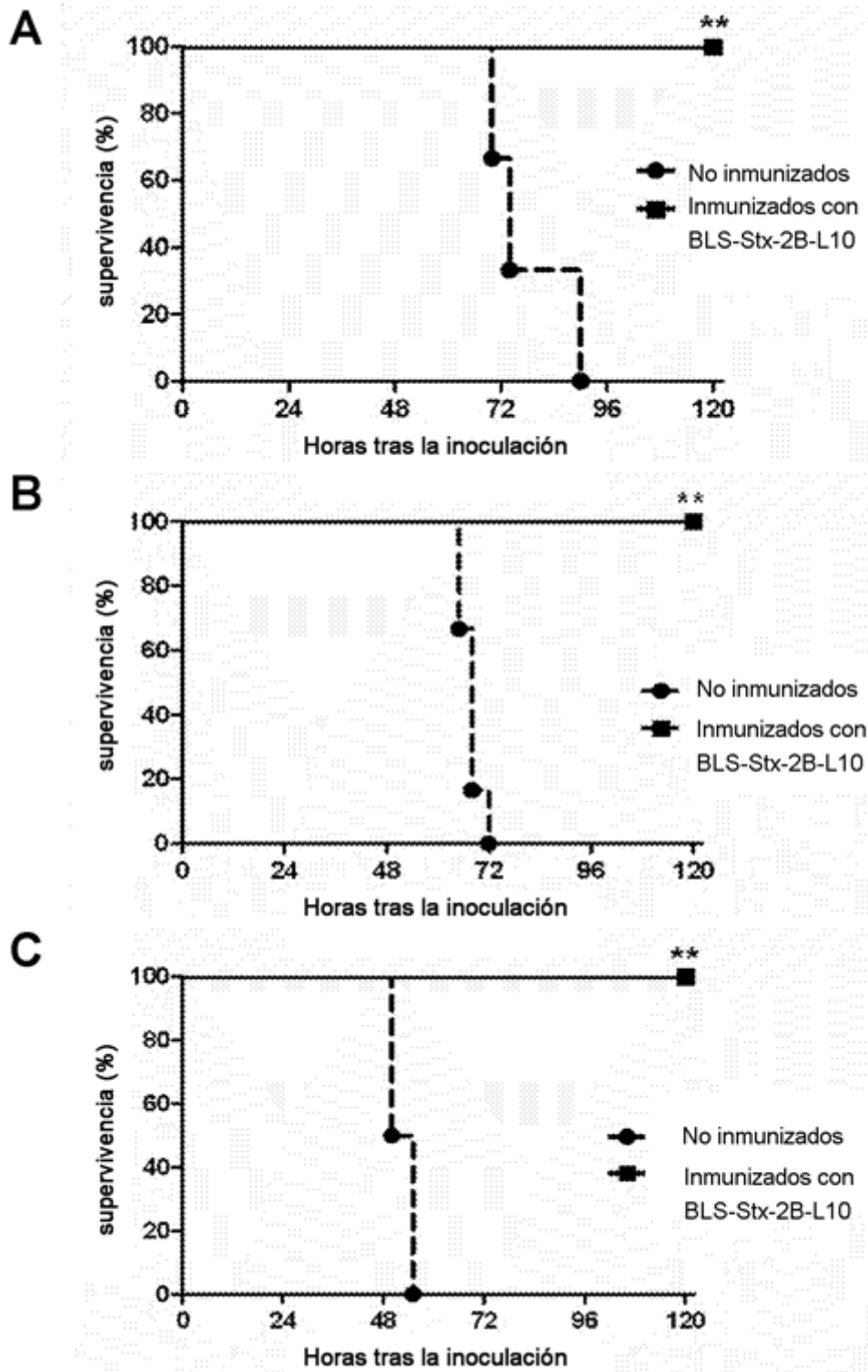


Figura 13