

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 045**

51 Int. Cl.:
C07K 14/245 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06748227 .3**
96 Fecha de presentación: **17.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1858919**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54 Título: **Inmunógenos de Escherichia coli uropatogénica**

30 Prioridad:
18.02.2005 US 654632 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.07.2012

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
4560 HORTON STREET
EMERYVILLE, CA 94608, US

72 Inventor/es:
PIZZA, Mariagrazia;
SERINO, Laura;
BERLANDA SCORZA, Francesco;
FONTANA, Maria Rita y
GOMES MORIEL, Danilo

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 385 045 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

Inmunógenos de *Escherichia coli* uropatogénica

Campo técnico

5 La presente invención es del campo de la biología de *Escherichia coli*, y en particular se refiere a inmunógenos para su uso en la inmunización contra cepas de *E. coli* patogénicas extraintestinales (ExPEC).

Técnica antecedente

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

10 Las cepas de *E. coli* se han clasificado tradicionalmente como comensales o patogénicos, y las cepas patogénicas entonces se subclasifican como cepas intestinales o extraintestinales. Las técnicas taxonómicas más recientes tales como electroforesis de enzimas multilocus (EEM) clasifican a *E. coli* en cinco grupos filogenéticos (A, B1, B2, D y E), y estas agrupaciones no coinciden con las tradicionales. Por ejemplo, el grupo B1 de EEM incluye cepas tanto comensales como patogénicas, y el grupo D incluye cepas tanto intestinales como extraintestinales.

15 Las cepas patogénicas extraintestinales (o cepas 'ExPEC' [1]) de *E. coli* pertenecen a los grupos B2 y D de EEM, e incluyen tanto cepas uropatogénicas (UPEC) como cepas asociadas con meningitis/sepsis (MNEC). Las cepas UPEC causan infecciones del tracto urinario (ITU), y son la forma más común de cistitis. También causan pielonefritis (y sus complicaciones tales como sepsis) e infecciones asociadas con catéteres. Las cepas MNEC causan meningitis en el neonato (0,1 casos por cada 1000 nacidos vivos) con tasas de letalidad que varían del 25 al
20 40%, y también son responsables de aproximadamente 1/6 de los casos de sepsis.

La mayoría de las vacunas previas contra ExPEC se han basado en lisados celulares o en estructuras celulares. SOLCOUROVAC™ incluye diez bacterias diferentes inactivadas por calor incluyendo seis cepas ExPEC, y se informó de un ensayo clínico en fase II satisfactorio en la referencia 2. URO-VAXOM™ es una vacuna en comprimido oral que contiene lisados bacterianos liofilizados de 18 cepas seleccionadas de *E. coli* [3]. Baxter Vaccines desarrolló una vacuna contra ITU basada en los pili de 6 a 10 cepas diferentes, pero este producto se ha abandonado. MedImmune desarrolló un producto llamado MEDI 516 basado en el complejo de adhesina FimH [4], pero los ensayos clínicos en fase II muestran eficacia inadecuada. Además, había riesgo con esta vacuna de que también se vieran afectadas las cepas no patogénicas FimH positivas en la flora intestinal normal, y se esperaba que esta vacuna fuera eficaz contra cepas UPEC solamente, a causa de su mecanismo de adherencia específico de vejiga, dejando a otras cepas ExPEC sin controlar.
25 30

Por tanto, existe la necesidad de vacunas mejoradas contra ExPEC, incluyendo la necesidad de alejarse de los lisados celulares en bruto y acercarse a moléculas mejor definidas, y la necesidad de identificar antígenos adicionales que sean adecuados para su inclusión en vacunas, particularmente antígenos que sean predominantes entre las cepas clínicas ExPEC sin encontrarse también en las cepas comensales.

35 Un modo de abordar estas necesidades se presentó en la referencia 5, donde los inventores buscaron genes presentes en los genomas de los tipos B2 y D de EEM pero ausentes de los tipos A y B1 de EEM. Se presentaron enfoques comparativos adicionales, basados en la hibridación sustractiva, en las referencias 6 y 7. También se han identificado los genes de virulencia en cepas ExPEC en la referencia 8. La referencia 9 divulga un análisis de cuatro islas de patogenicidad en la cepa UPEC de *E. coli* 536.

40 La referencia 10 usó la secuencia genómica de la cepa UPEC (O6:K2:H1) CFT073 [11,12] para identificar secuencias no presentes en cepas no patogénicas de *E. coli*. La referencia 13 describe una comparación de la secuencia genómica del aislado 536 de *E. coli* de la pielonefritis humana (O6:K15:H31), una UPEC, con datos de secuencia para las cepas CFT073 (UPEC), EDL933 (enterohemorrágica) y MG1655 (cepa de laboratorio no patogénica). Las secuencias genómicas de cepas patogénicas están disponibles en las bases de datos con los
45 números de acceso AE005174, BA000007 y NC-004431. Una secuencia de una cepa no patogénica está disponible con el número de acceso U00096.

Un objeto de la invención es proporcionar antígenos adicionales para su uso en la inmunización contra cepas patogénicas de *E. coli*, particularmente cepas ExPEC, y más particularmente cepas UPEC.

50 El número de acceso Q8FAG2 de la base de datos EBI UNIPROT ("SubNombre: proteína conservada Completa=Putativa") es una proteína de *E. coli* no caracterizada como de interés para uso médico. Welch y col.: Proc Natl Acad Sci USA 99, 17020-17024 informan sobre que la secuencia genómica completa de *Escherichia coli* uropatogénica manifiesta una estructura extensiva en mosaico. El documento WO03074553 (A2) se refiere a nuevos productos específicos para cepas bacterianas patogénicas y su uso como vacunas y en inmunoterapia.

Sumario de la invención

5 Los inventores han identificado diversos genes que pueden incluirse en composiciones inmunogénicas específicas para cepas patogénicas de *E. coli*. Los genes son de cepas uropatogénicas (UPEC) pero están ausentes de cepas no patogénicas, y sus proteínas codificadas tienen localizaciones celulares que las vuelven accesibles para el sistema inmune.

10 En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende: (a) la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 577; (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 577; (c) una secuencia de aminoácidos que es un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N° 577; o (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 577 y que incluye un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N° 577, para su uso en medicina. Realizaciones adicionales de la invención se definen en las reivindicaciones.

En una realización particular, los polipéptidos de la invención comprenden un fragmento que comprende al menos un epítoto de células B de (a).

15 Los polipéptidos de la invención pueden usarse en medicina y en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un paciente.

20 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención además se refiere a una composición farmacéutica que comprende dos o más polipéptidos de la invención en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención además comprenden un adyuvante de vacuna.

En este documento se divulgan procedimientos para provocar una respuesta inmune en un paciente, que comprenden la etapa de administrar al paciente una composición farmacéutica o composición inmunogénica de la invención. En una realización particular, la respuesta inmune es protectora contra infección por ExPEC.

A continuación se describen aspectos adicionales de la invención.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones tras su exposición con CFT073 después de inmunización con CFT073 inactivado por calor.

Descripción detallada de la invención

30 Los inventores han identificado diversos genes que pueden incluirse en composiciones inmunogénicas específicas para cepas patogénicas de *E. coli*. Los genes son de cepas UPEC pero están ausentes de cepas no patogénicas, y sus proteínas codificadas tienen localizaciones celulares que las vuelven accesibles para el sistema inmune.

Polipéptidos

En este documento se describen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos descritas en los ejemplos. Las secuencias de aminoácidos se dan en la lista de secuencias como SEC ID N° 1 a 596 y 597 a 599.

35 La secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 577 es

ES 2 385 045 T3

Met Lys Lys Ser Leu Leu Ala Val Met Leu Thr Gly Leu Phe Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Ser Leu Pro Ala Leu Gly Asn Val Asn Leu Glu Gln Leu Lys Gln
 20 25 30
 Lys Ala Glu Ser Gly Glu Ala Lys Ala Gln Leu Glu Leu Gly Tyr Arg
 35 40 45
 Tyr Phe Gln Gly Asn Glu Thr Thr Lys Asp Leu Thr Gln Ala Met Asp
 50 55 60
 Trp Phe Arg Arg Ala Ala Glu Gln Gly Tyr Thr Pro Ala Glu Tyr Val
 65 70 75 80
 Leu Gly Leu Arg Tyr Met Asn Gly Glu Gly Val Pro Gln Asp Tyr Ala
 85 90 95
 Gln Ala Val Ile Trp Tyr Lys Lys Ala Ala Leu Lys Gly Leu Pro Gln
 100 105 110
 Ala Gln Gln Asn Leu Gly Val Met Tyr His Glu Gly Asn Gly Val Lys
 115 120 125
 Val Asp Lys Ala Glu Ser Val Lys Trp Phe Arg Leu Ala Ala Glu Gln
 130 135 140
 Gly Arg Asp Ser Gly Gln Gln Ser Met Gly Asp Ala Tyr Phe Glu Gly
 145 150 155 160
 Asp Gly Val Thr Arg Asp Tyr Val Met Ala Arg Glu Trp Tyr Ser Lys
 165 170 175
 Ala Ala Glu Gln Gly Asn Val Trp Ser Cys Asn Gln Leu Gly Tyr Met
 180 185 190

ES 2 385 045 T3

Tyr Ser Arg Gly Leu Gly Val Glu Arg Asn Asp Ala Ile Ser Ala Gln
 195 200 205
 Trp Tyr Arg Lys Ser Ala Thr Ser Gly Asp Glu Leu Gly Gln Leu His
 210 215 220
 Leu Ala Asp Met Tyr Tyr Phe Gly Ile Gly Val Thr Gln Asp Tyr Thr
 225 230 235 240
 Gln Ser Arg Val Leu Phe Ser Gln Ser Ala Glu Gln Gly Asn Ser Ile
 245 250 255
 Ala Gln Phe Arg Leu Gly Tyr Ile Leu Glu Gln Gly Leu Ala Gly Ala
 260 265 270
 Lys Glu Pro Leu Lys Ala Leu Glu Trp Tyr Arg Lys Ser Ala Glu Gln
 275 280 285
 Gly Asn Ser Asp Gly Gln Tyr Tyr Leu Ala His Leu Tyr Asp Lys Gly
 290 295 300
 Ala Glu Gly Val Ala Lys Asn Arg Glu Gln Ala Ile Ser Trp Tyr Thr
 305 310 315 320
 Lys Ser Ala Glu Gln Gly Asp Ala Thr Ala Gln Ala Asn Leu Gly Ala
 325 330 335
 Ile Tyr Phe Arg Leu Gly Ser Glu Glu Glu His Lys Lys Ala Val Glu
 340 345 350
 Trp Phe Arg Lys Ala Ala Ala Lys Gly Glu Lys Ala Ala Gln Phe Asn
 355 360 365
 Leu Gly Asn Ala Leu Leu Gln Gly Lys Gly Val Lys Lys Asp Glu Gln
 370 375 380
 Gln Ala Ala Ile Trp Met Arg Lys Ala Ala Glu Gln Gly Leu Ser Ala

- 80, 90, 100 o más). El fragmento puede comprender al menos un epítope de células T o, preferiblemente, de células B de la secuencia. Los epítopes de células T y B pueden identificarse empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN [14,15] o procedimientos similares), o pueden predecirse (por ejemplo, usando el índice antigénico de Jameson-Wolf [16], enfoques basados en matriz [17], TEPITOPE [18], redes neurales [19], OptiMer y EpiMer [20,21],
- 5 ADEPT [22], Tsites [23], la hidrofiliidad [24], el índice antigénico [25] o los procedimientos descritos en la referencia 26, etc.). Otros fragmentos preferidos son (a) los péptidos señal N-terminales de los polipéptidos de la invención, (b) los polipéptidos, pero sin sus péptidos señal N-terminales, (c) los polipéptidos, pero sin su resto aminoacídico N-terminal.
- Otros fragmentos preferidos son aquellos que comienzan con un aminoácido codificado por un codón de inicio potencial (ATG, GTG, TTG). Los fragmentos que comienzan en la metionina codificada por un codón de inicio cadena abajo del codón de inicio indicado son polipéptidos de la invención.
- Otros fragmentos preferidos son aquellos que son habituales para un polipéptido de la invención y para un polipéptido identificado en cualquiera de las referencias 5, 6, 8, 10 y 11.
- Los polipéptidos de la invención pueden prepararse de muchos modos, por ejemplo, por síntesis química (por completo o en parte), por digestión de polipéptidos más largos usando proteasas, por traducción a partir del ARN, por purificación del cultivo celular (por ejemplo, a partir de expresión recombinante), del propio organismo (por ejemplo, después de cultivo bacteriano, o directamente de pacientes), etc. Un procedimiento preferido para la producción de péptidos <40 aminoácidos de longitud implica síntesis química *in vitro* [27,28]. La síntesis peptídica en fase sólida es particularmente preferida, tal como procedimientos basados en química de tBoc o Fmoc [29]. También
- 15 puede usarse síntesis enzimática [30] en parte o por completo. Como alternativa a la síntesis química, puede usarse la síntesis biológica, por ejemplo, los polipéptidos pueden producirse por traducción. Esto puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. Los procedimientos biológicos están, en general, restringidos a la producción de polipéptidos basados en L-aminoácidos, pero puede usarse la manipulación de la maquinaria de traducción (por ejemplo, de moléculas de aminoacil ARNt) para permitir la introducción de D-aminoácidos (o de otros aminoácidos no naturales, tales como yodotirosina o metilfenilalanina, azidohomoalanina, etc.) [31]. Cuando se incluyen D-aminoácidos, sin embargo, se prefiere usar síntesis química. Los polipéptidos de la invención pueden tener modificaciones covalentes en el extremo C y/o el extremo N.
- Los polipéptidos de la invención pueden adoptar diversas formas (por ejemplo, nativa, fusiones, glicosilada, no glicosilada, lipidada, no lipidada, fosforilada, no fosforilada, miristoilada, no miristoilada, monomérica, multimérica,
- 30 particulada, desnaturalizada, etc.).
- Los polipéptidos de la invención se proporcionan preferiblemente en forma purificada o sustancialmente purificada, es decir, sustancialmente libre de otros polipéptidos (por ejemplo, libre de polipéptidos de origen natural), particularmente de otros polipéptidos de ExPEC o células huésped, y generalmente son al menos aproximadamente un 50% puros (en peso), y habitualmente al menos aproximadamente un 90% puros, es decir, menos de
- 35 aproximadamente el 50%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 10% (por ejemplo, el 5% o menos) de una composición está compuesta por otros polipéptidos expresados. Los polipéptidos de la invención son preferiblemente polipéptidos de ExPEC.
- Los polipéptidos de la invención pueden unirse a un soporte sólido. Los polipéptidos de la invención pueden comprender un marcador detectable (por ejemplo, un marcador radiactivo o fluorescente, o un marcador de biotina).
- 40 El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. El término también abarca un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por
- 45 ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de aminoácidos (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden existir como cadenas individuales o cadenas asociadas. Los polipéptidos de la invención pueden glicosilarse de forma natural o no natural (es decir, el polipéptido tiene un patrón de glicosilación que difiere del patrón de glicosilación encontrado en el polipéptido correspondiente de origen natural).
- Los polipéptidos de la invención pueden ser de al menos 40 aminoácidos de longitud (por ejemplo, de al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350, 400, 450, 500 o más). Los polipéptidos de la invención pueden ser más cortos de 500 aminoácidos (por ejemplo, no más largos de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350, 400 ó 450 aminoácidos).
- La invención proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia -X-Y- o -Y-X-, en la que: -X- es una
- 55 secuencia de aminoácidos definida anteriormente e -Y- no es una secuencia definida anteriormente, es decir, la invención proporciona proteínas de fusión. Cuando el codón N-terminal de una secuencia codificante de un polipéptido no es ATG, entonces ese codón se traducirá como el aminoácido habitual para ese codón en lugar de como una Met, lo que sucede cuando el codón se traduce como codón de inicio.

La invención proporciona un procedimiento para producir polipéptidos de la invención, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped de la invención en condiciones que inducen la expresión del polipéptido.

La invención proporciona un procedimiento para producir un polipéptido de la invención, en el que el polipéptido se sintetiza en parte o por completo usando medios químicos.

5 La invención proporciona una composición que comprende dos o más polipéptidos de la invención.

La invención también proporciona un polipéptido híbrido representado por la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que X es un polipéptido de la invención definido anteriormente, L es una secuencia de aminoácidos enlazadora adicional, A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional, B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional, y n es un número entero mayor de 1. El valor de n está entre 2 y x , y el valor de x es típicamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. Preferiblemente n es 2, 3 ó 4; más preferiblemente es 2 ó 3; mucho más preferiblemente, $n = 2$. Para cada caso de n , -X- puede ser igual o diferente. Para cada caso de n , en [-X-L-], la secuencia de aminoácidos enlazadora -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando $n=2$, el híbrido puede ser $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-OOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, etc. La secuencia o secuencias de aminoácidos enlazadoras -L- típicamente serán cortas (por ejemplo, de 20 o menos aminoácidos, es decir, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación, enlazadores de poli-glicina (es decir, Gly_n donde $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), y marcas de histidina (es decir, His_n donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos enlazadoras adecuadas serán evidentes para los especialistas en la técnica. -A- y -B- son secuencias opcionales que típicamente serán cortas (por ejemplo, de 40 o menos aminoácidos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico del polipéptido, o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, marcas de histidina, es decir, His_n donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos N-terminales y C-terminales adecuadas serán evidentes para los especialistas en la técnica.

25 Pueden usarse diversos ensayos para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, los polipéptidos pueden expresarse de forma recombinante y usarse para explorar los sueros de pacientes por inmunotransferencia. Una reacción positiva entre el polipéptido y el suero del paciente indica que el paciente ha montado previamente una respuesta inmune contra la proteína en cuestión, es decir, la proteína es un inmunógeno. Este procedimiento también puede usarse para identificar proteínas inmunodominantes.

Composiciones farmacéuticas

30 La invención proporciona composiciones que comprenden: (a) polipéptido de la invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden ser adecuadas como composiciones inmunogénicas, por ejemplo, o como reactivos de diagnóstico, o como vacunas. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir infecciones) o terapéuticas (es decir, para tratar infecciones), pero típicamente serán profilácticas.

35 En un aspecto particular, la invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden una o más vesículas de membrana externa (VME) que expresan o sobreexpresan uno o más polipéptidos de la invención.

Un 'vehículo farmacéuticamente aceptable' incluye cualquier vehículo que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa, y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, y similares. Un vehículo típico es solución salina fisiológica tamponada con fosfato, libre de pirógenos estéril. Está disponible un análisis minucioso de excipientes farmacéuticamente aceptables en la ref. 296. Las composiciones de la invención pueden incluir un agente antimicrobiano, particularmente si están envasadas en un formato multidosis.

Las composiciones de la invención pueden comprender detergente, por ejemplo, Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes están generalmente presentes a bajos niveles, por ejemplo, <0,01%.

50 Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro sódico) para dar tonicidad. Es típica una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl.

Las composiciones de la invención generalmente incluirán un tampón. Es típico un tampón fosfato.

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

polipéptidos de la invención pueden administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones habitualmente incluirán un adyuvante de vacuna. El adyuvante puede seleccionarse entre uno o más del grupo compuesto por un adyuvante TH1 y adyuvante TH2, analizados adicionalmente a continuación. Los adyuvantes que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, aunque sin limitación:

5 A. Composiciones que contienen minerales

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

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

El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de hidroxilo por fosfato, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la concentración de los reactivos usados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = PZC más ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón histidina (hace el PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención generalmente tendrán un PZC entre 4,0 y 7,0, más preferiblemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo, de aproximadamente 5,7.

Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un tampón fosfato o histidina o Tris), pero no siempre esto es necesario. Las suspensiones son preferiblemente estériles y libres de pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuosos libres, por ejemplo, presentes a una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferiblemente entre 5 y 15 mM, y más preferiblemente de aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro sódico.

La invención puede usar una mezcla tanto de un hidróxido de aluminio como de un fosfato de aluminio. En este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una proporción ponderal de al menos 2:1 1 por ejemplo $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc.

Pueden incluirse sales de aluminio en vacunas de la invención de modo que la dosis de Al^{3+} esté entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

B. Emulsiones oleosas

Las composiciones de emulsión oleosa adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (5% de Escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidizador) [Capítulo 10 de la ref. 53; véanse también las ref. 55-57, capítulo 12 de la ref. 58]. MF59 se usa como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente FLUAD™ contra el virus de la influenza. La emulsión incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato sódico 10 mM.

Adyuvantes particularmente preferidos para su uso en las composiciones son emulsiones submicrométricas de aceite-en-agua. Emulsiones submicrométricas de aceite-en-agua preferidas para su uso en este documento son emulsiones de escualeno/agua que contienen opcionalmente cantidades variables de MTP-PE, tal como una emulsión submicrométrica de aceite-en-agua que contienen un 4-5% p/v de escualeno, un 0,25-1,0% p/v de Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán), y/o un 0,25-1,0% de Span 85 (trioleato de sorbitán) y, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE). Las emulsiones submicrométricas de aceite-en-agua, los procedimientos para preparar las mismas y los agentes inmunoestimuladores, tales como muramil péptidos, para su uso en las composiciones, se describen en detalle en las referencias 55 y 59-60.

Puede usarse una emulsión de escualeno, un tocoferol, y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10% de tocoferol y del 0,3 al 3% de Tween 80, y la proporción ponderal de escualeno:tocoferol es preferiblemente ≤ 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. Una de dichas emulsiones puede prepararse disolviendo Tween 80 en PBS para dar una solución al 2%, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), después microfluidizando la

mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas submicrométricas de aceite, por ejemplo, con un diámetro promedio entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm.

Puede usarse una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100).

5 Puede usarse una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de suministro útil para muramil dipéptidos, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [61] (0,05-1% de Thr-MDP, 5% de escualano, 2,5% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). También puede usarse sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [62] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.

10 También pueden usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) como adyuvantes en la invención.

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

15 También pueden usarse formulaciones de saponina como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia variedad de especies vegetales. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse en el mercado de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officinalis* (hierba jabonera). Las formulaciones de adyuvante saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM.

20 Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Se describe un procedimiento de producción de QS21 en la ref. 63. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol [64].

25 Pueden usarse combinaciones de saponinas y colesterol para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimuladores (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 53]. Los ISCOM típicamente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferiblemente, el ISCOM incluye una o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las ref. 64-66. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente(s) adicional(es) [67].

Puede encontrarse una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina en las ref. 68 y 69.

30 D. Viroomas y partículas tipo virus

También pueden usarse virosomas y partículas tipo virus (VLP) como adyuvantes en la invención. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Generalmente son no patogénicas, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la influenza (tales como HA o NA), el virus de la hepatitis B (tal como proteínas del núcleo o la cápsida), el virus de la hepatitis E, el virus del sarampión, el virus Sindbis, rotavirus, el virus de la fiebre aftosa, retrovirus, el virus Norwalk, el virus del papiloma humano, VIH, fagos ARN, fago Q β (tal como proteínas de cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205, y Ty (tal como la proteína pl del retrotransposón Ty). Las VLP se analizan adicionalmente en las ref. 70-75. Los virosomas se analizan adicionalmente en, por ejemplo, la ref. 76.

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados de Lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados de los mismos. Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se describe en la ref. 77. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son suficientemente pequeñas para filtrarse a esterilidad a través de una membrana de 0,22 μ m [77]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados fosfato de aminoalquil glucosaminida por ejemplo RC-529 [78,79].

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en las ref. 80 y 81.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias nucleotídicas que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no

metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina). También se ha demostrado que ARN bicatenarios y oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimuladoras.

Las CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 82, 83 y 84 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, el reemplazo de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en las ref. 85-90.

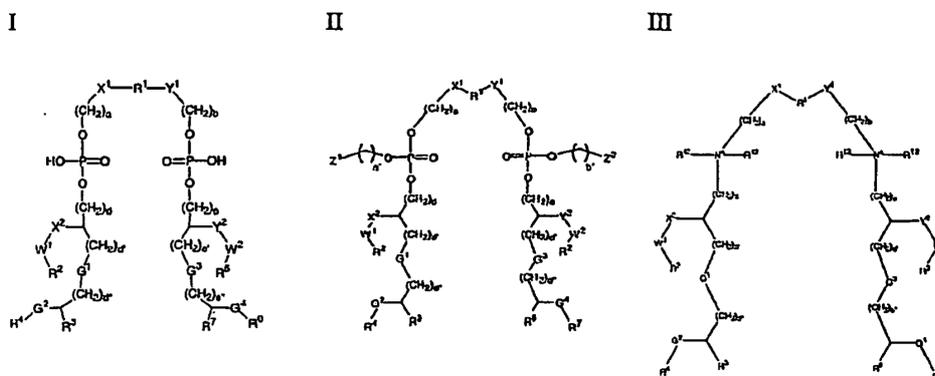
La secuencia CpG puede estar dirigida a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [91]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específico para inducir una respuesta de células B, tal como un CpG-B ODN. Los ODN CpG-A y CpG-B se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

Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de tal modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, pueden unirse dos secuencias de oligonucleótido CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las ref. 91 y 95-97.

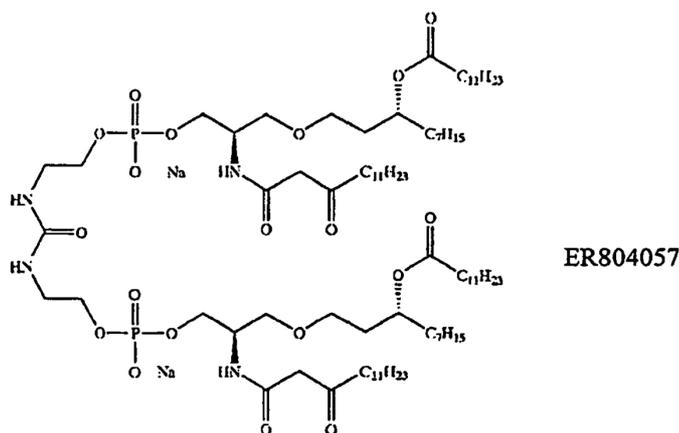
Otros oligonucleótidos inmunoestimuladores incluyen un ARN bicatenario, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia poli(dG).

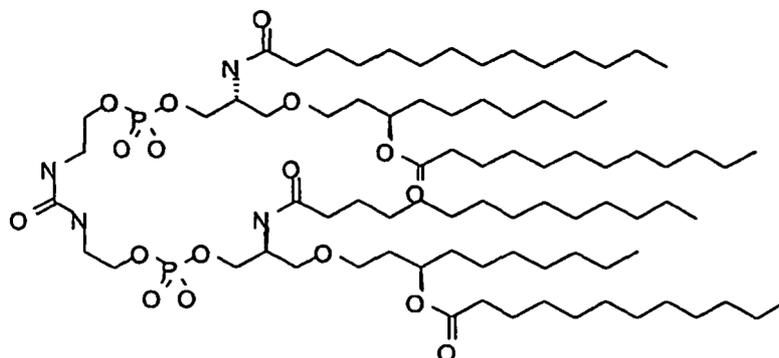
Pueden usarse toxinas ADP-ribosilantes bacterianas y derivados detoxificados de las mismas como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína se obtiene de *E. coli* (enterotoxina "LT" inestable al calor de *E. coli*), cólera ("CT"), o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ADP-ribosilantes detoxificadas como adyuvantes de mucosa se describe en la ref. 98 y como adyuvantes parenterales en la ref. 99. La toxina o toxoide está preferiblemente en forma de una holotoxina, que comprende ambas subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutaciones detoxificante; preferiblemente la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el adyuvante es una LT detoxificada mutante tal como LT-K63, LT-R72, y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las ref. 100-107. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferiblemente en las alineaciones de las subunidades A y B de toxinas ADP-ribosilantes expuestas en la ref. 108.

Los compuestos de fórmula I, II o III, o sales de los mismos, también pueden usarse como adyuvantes:



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





ER-803022:

F. Inmunomoduladores humanos

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

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [113] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosana y derivados de la misma como adyuvantes en la invención [114].

H. Micropartículas

También pueden usarse micropartículas como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm a ~30 μ m de diámetro, y mucho más preferiblemente de ~500 nm a ~10 μ m de diámetro) formadas de materiales que son biodegradable y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α -hidroxi ácido), un ácido polihidroxi-butírico, un polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

L. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la ref. 53)

Se describen ejemplos de formulaciones de liposoma adecuadas para su uso como adyuvantes en las ref. 115-117.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [118]. Dichas formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol [119] así como tensioactivos de alquil éter o éster de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [120]. Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan entre el siguiente grupo: polioxietilen-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilen-9-estearil éter, polioxietilen-8-estearil éter, polioxietilen-4-lauril éter, polioxietilen-35-lauril éter, y polioxietilen-23-lauril éter.

K. Fosfacenos por ejemplo PCPP

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

L. Muramil péptidos

Los ejemplos de muramil péptidos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

M. Compuestos de imidazoquinolina

Los adyuvantes de imidazoquinolina incluyen Imiquimod ("R-837") [123,124], Resiquimod ("R-848") [125], y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, las sales clorhidrato). Pueden encontrarse detalles adicionales acerca de imidazoquinolinas inmunoestimuladoras en las referencias 126 a 130.

N. Compuestos de tiosemicarbazona

Los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como procedimientos para formular, fabricar, y seleccionar compuestos todos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la ref. 131. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- α .

5

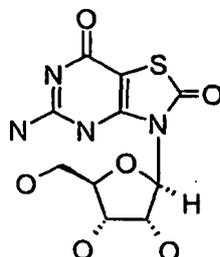
O. Compuestos de triptantrina

Los ejemplos de compuestos de triptantrina, así como los procedimientos para formular, fabricar, y selecciona compuestos todos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la ref. 132. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononuclear de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- α .

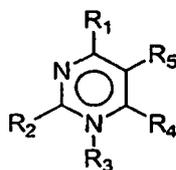
10

P. Análogos nucleosídicos

Pueden usarse diversos análogos nucleosídicos como adyuvantes, tales como (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):

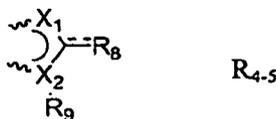


15 y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos divulgados en las referencias 133 a 135; (f) un compuesto que tiene la fórmula:



en la que:

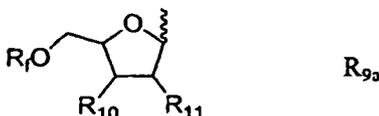
20 R_1 y R_2 son cada uno independientemente H, halo, $-NR_aR_b$, $-OH$, alcoxi C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C_{6-10} , arilo C_{6-10} sustituido, alquilo C_{1-6} , o alquilo C_{1-6} sustituido; R_3 está ausente, H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, arilo C_{6-10} , arilo C_{6-10} sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido; R_4 y R_5 son cada uno independientemente H, halo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, $-C(O)-R_d$, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, o están unidos juntos para formar un anillo de 5 miembros como en R_{4-5} :



25

consiguiéndose la unión en los enlaces indicados por un \sim X_1 y X_2 son cada uno independientemente N, C, O, o S; R_8 es H, halo, $-OH$, alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} , alquino C_{2-6} , $-OH$, $-NR_aR_b$, $-(CH_2)_n-O-R_e$, $-O-(alquilo C_{1-6})$, $-S(O)_pR_e$, o $-C(O)-R_d$; R_9 es H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R_{9a} , en el que R_{9a} es:

30



consiguiéndose la unión en los enlaces indicados por un 

R₁₀ y R₁₁ son cada uno independientemente H, halo, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NR_aR_b, o -OH;

cada R_a y R_b es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, arilo C₆₋₁₀;

cada R_e es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C₁₋₆, o alquilo C₁₋₆ sustituido;

5 cada R_d es independientemente H, halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆), -NH(alquilo C₁₋₆ sustituido), -N(alquilo C₁₋₆), -N(alquilo C₁₋₆ sustituido)₂, arilo C₆₋₁₀, o heterociclilo;

cada R_e es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;

10 cada R_f es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, fosfato, difosfato, o trifosfato;

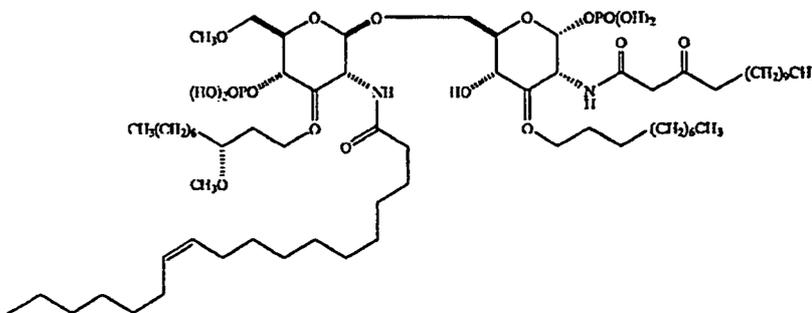
cada n es independientemente 0, 1, 2 ó 3;

cada p es independientemente 0, 1 ó 2; o

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

15 Q. *Lípidos ligados a una estructura acíclica que contiene fosfato*

Los adyuvantes que contienen lípidos ligados a una estructura acíclica que contiene fosfato incluyen el antagonista E5564 de TLR4 [136,137]:



R. *Inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIP)*

20 Los SMIP incluyen:

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 25 • 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 30 • 1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
- 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
- 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol;
- acetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etilo;
- 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona;
- 35 • N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 1-[4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol;
- 40 • 1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol;
- N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina.

S. *Proteasomas*

Un adyuvante es una preparación de proteasoma de proteínas de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de lipopolisacárido derivada de una segunda bacteria Gram-negativa, en el que las preparaciones de proteasoma de proteínas de membrana externa y de lipopolisacárido forman un complejo adyuvante estable no covalente.

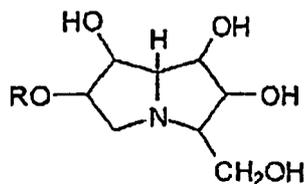
45

Dichos complejos incluyen "IVX-908", un complejo compuesto por la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos. Se han usado como adyuvantes para vacunas contra la influenza [138].

T. Otros adyuvantes

5 Se describen otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores en las referencias 53 y 58. Las sustancias adyuvantes útiles adicionales incluyen:

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



10 en la que R se selecciona entre el grupo compuesto por hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alqueno, alquino y arilo lineales o ramificados, sin sustituir o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-*diepi*-casuarina, etc.

- A gamma inulina [141] o derivado de la misma, tal como algamulina.
- Compuestos descritos en la referencia 142.
- 15 • Compuestos descritos en la referencia 143, incluyendo: compuestos de cillpiperazina, compuestos de indoleidona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazol quinolinona (ABIQ) [144,145], compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de estero, compuestos de quinazolinona, compuestos de pirrol [146], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina, y compuestos de benzazol [147].
- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [148].
- Una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (habitualmente neutro), tal como bromuro de aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanaminio - difitanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") o bromuro de aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanaminio - dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren formulaciones que contienen sales de (\pm)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(sin-9-tetradecenoiloxi)-1-propanaminio [149].

La invención también puede comprender combinaciones de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes combinaciones como composiciones adyuvantes en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite-en-agua [150]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [151]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un estero) [152]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite-en-agua [153]; (6) SAF, que contiene un 10% de escualano, un 0,4% de Tween 80™, un 5% de polímero de bloque pluronic L121, y thr-iVIDP, microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con vórtice para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula; (7) sistema adyuvante Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene un 2% de escualano, un 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo compuesto por monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL); y (9) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulador (tal como una secuencia nucleotídica que incluye un motivo CpG).

Las composiciones de la invención provocarán preferiblemente tanto una respuesta inmune mediada por células como una respuesta inmune humoral para abordar de forma eficaz una infección uropatogénica. Esta respuesta inmune preferiblemente inducirá anticuerpos de larga duración (por ejemplo, neutralizantes) y una inmunidad mediada por células que puede responder rápidamente después de exposición a antígenos asociados a UPEC.

45 Generalmente se creen necesarios dos tipos de células T, células CD4 y CD8, para iniciar y/o potenciar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. Las células T CD8 puede expresar un co-receptor CD8 y se conocen habitualmente como linfocitos T citotóxicos (CTL). Las células T CD8 son capaces de reconocer o interactuar con antígenos presentados en moléculas MHC clase I. Las células T CD4 pueden expresar un co-receptor CD4 y se conocen habitualmente como células T auxiliares. Las células T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a moléculas MHC clase II. Tras la interacción con una molécula MHC clase II, las células CD4 pueden secretar factores tales como citoquinas. Estas citoquinas secretadas pueden activar células B, células T citotóxicas, macrófagos, y otras células que participan en una respuesta inmune. Las células T auxiliares o células

CD4⁺ pueden dividirse adicionalmente en dos subconjuntos funcionalmente diferentes: fenotipo TH1 y fenotipo TH2 que difieren en su citoquina y función efectora.

5 Las células TH1 activadas potencian la inmunidad celular (incluyendo un aumento en la producción de CTL específicos de antígeno) y por lo tanto son de particular valor en la respuesta a infecciones intracelulares. Las células TH1 activadas pueden secretar una o más de IL-2, IFN- γ , y TNF- β . Una respuesta inmune TH1 puede provocar reacciones inflamatorias locales activando macrófagos, células NK (asesinas naturales), y células T citotóxicas CD8 (CTL). Una respuesta inmune TH1 también puede actuar expandiendo la respuesta inmune estimulando el crecimiento de células B y T con IL-12. Las células B estimuladas por TH1 pueden secretar IgG2a.

10 Las células TH2 activadas potencian la producción de anticuerpos y por lo tanto son de particular valor en la respuesta a infecciones extracelulares. Las células TH2 activadas pueden secretar una o más de IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10. Una respuesta inmune TH2 puede provocar la producción de IgG1, IgE, IgA y células B de memoria para la futura protección.

15 Una respuesta inmune potenciada puede incluir una o más de una respuesta inmune TH1 potenciada y una respuesta inmune TH2. Una respuesta inmune TH1 potenciada puede incluir uno o más de un aumento en los CTL, un aumento en una o más de las citoquinas asociadas con una respuesta inmune TH1 (tal como IL-2, IFN- γ , y TNF- β), un aumento en macrófagos activados, un aumento en la actividad NK, o un aumento en la producción de IgG2a. Preferiblemente, la respuesta inmune TH1 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG2a. Una respuesta inmune TH2 potenciada puede incluir uno o más de un aumento en una o más de las citoquinas asociadas con una respuesta inmune TH2 (tal como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), o un aumento en la producción de IgG1, IgE, IgA y células B de memoria. Preferiblemente, la respuesta inmune TH2 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG41.

20 Una respuesta inmune TH1 puede provocarse usando un adyuvante TH1. Un adyuvante TH1 generalmente provocará niveles aumentados de producción de IgG2a relativos a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes TH1 adecuados para su uso en la invención pueden incluir, por ejemplo, formulaciones de saponina, virosomas y partículas tipo virus, derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), oligonucleótidos inmunoestimuladores. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores, tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG, son adyuvantes TH1 preferidos para su uso en la invención.

25 Una respuesta inmune TH2 puede provocarse usando un adyuvante TH2. Un adyuvante TH2 generalmente provocará niveles aumentados de producción de IgG1 relativos a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes TH2 adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, composiciones que contienen minerales, emulsiones oleosas, y toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados de las mismas. Las composiciones que contienen minerales, tales como sales de aluminio, son adyuvantes TH2 preferidos para su uso en la invención.

30 Preferiblemente, la invención incluye una composición que comprende una combinación de un adyuvante TH1 y un adyuvante TH2. Preferiblemente, dicha composición provoca una respuesta TH1 potenciada y una TH2 potenciada, es decir, un aumento en la producción tanto de IgG1 como de IgG2a relativa a la inmunización sin un adyuvante. Aún más preferiblemente, la composición que comprende una combinación de un adyuvante TH1 y TH2 provoca una respuesta inmune TH1 aumentada y/o una TH2 aumentada relativa a la inmunización con un único adyuvante (es decir, relativa a la inmunización con un adyuvante TH1 solo o la inmunización con un adyuvante TH2 solo).

35 La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune TH1 o una respuesta TH2 o ambas. Preferiblemente, la respuesta inmune proporciona una respuesta TH1 potenciada o una respuesta TH2 potenciada o ambas.

40 La respuesta inmune potenciada puede ser una respuesta inmune sistémica o mucosa o ambas. Preferiblemente, la respuesta inmune proporciona una respuesta inmune sistémica potenciada o mucosa potenciada o ambas. Preferiblemente, la respuesta inmune mucosa es una respuesta inmune TH2. Preferiblemente, la respuesta inmune mucosa incluye un aumento en la producción de IgA.

45 El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio es particularmente preferido, y los antígenos generalmente se adsorben en estas sales. El fosfato de calcio es otro adyuvante preferido.

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

55 Las composiciones pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringas ya cargadas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una única dosis o múltiples dosis. Las composiciones inyectables habitualmente serán soluciones o suspensiones líquidas. Como alternativa, pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo, secadas por congelación) para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de su inyección.

Las composiciones de la invención pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de múltiples dosis. Para formas de múltiples dosis, se prefieren viales a jeringas pre-cargadas. Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse rutinariamente, pero una dosis humana típica de la composición para su inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

- 5 Cuando una composición de la invención tiene que prepararse de forma improvisada antes de su uso (por ejemplo, cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa ya cargada y un vial, usándose los contenidos de la jeringa para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

- 10 Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz del antígeno o antígenos, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, en una única dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo de sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica por parte de los médicos responsables, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté en un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de ensayos rutinarios, y una cantidad típica de cada antígeno sacárido meningocócico por dosis es entre 1 µg y 10 mg por antígeno.

Usos farmacéuticos

- 20 La invención puede usarse en un procedimiento para tratar a un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención. El paciente puede estar en sí mismo en riesgo de la enfermedad o puede ser una mujer embarazada ('inmunización materna' [155]).

- 25 La invención proporciona el polipéptido de la invención para su uso como medicamentos (por ejemplo, como composiciones inmunogénicas o como vacunas) o como reactivos de diagnóstico. También proporciona el uso del polipéptido de la invención en la fabricación de: (i) un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad y/o infección causada por una bacteria ExPEC; (ii) un reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de o de anticuerpos producidos contra una bacteria ExPEC; y/o (iii) un reactivo que puede producir anticuerpos contra una bacteria ExPEC. Dicha bacteria ExPEC puede ser de cualquier serotipo o cepa. Preferiblemente, la bacteria ExPEC es una cepa UPEC.

- 30 La invención se útil para la prevención y/o tratamiento de enfermedades tales como bacteremia, meningitis, una infección del tracto urinario, pielonefritis y/o cistitis. La invención es particularmente útil para el tratamiento de infecciones del tracto urinario.

- 35 El paciente es preferiblemente un ser humano. El ser humano es preferiblemente un adulto (por ejemplo, con una edad entre 20 y 55). También puede administrarse una vacuna pretendida para niños o adolescentes a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc. Los pacientes mujeres son un subconjunto preferido, siendo las mujeres sexualmente activas con una edad de 20-55 un grupo de pacientes particularmente preferido. Otros grupos de pacientes son mujeres con una edad de 12-20, particularmente para uso profiláctico.

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

- 40 Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica controlar la infección después de la administración de la composición de la invención. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica controlar las respuestas inmunes contra un polipéptido administrado después de la administración. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede determinarse administrándolas a sujetos de ensayo (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad, o modelos animales, por ejemplo, un modelo de ratón) y después determinando el parámetro patrón incluyendo títulos ELISA (GMT) de IgG. Estas respuestas inmunes generalmente se determinarán aproximadamente 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararán con valores determinados antes de la administración de la composición. Cuando se administra más de una dosis de la composición, puede hacerse más de una determinación posterior a la administración. Están disponibles diversos modelos de ratón de ITU [por ejemplo ref. 158 y 159-160].

- 50 La administración de antígenos polipeptídicos es un procedimiento preferido de tratamiento para inducir inmunidad. La administración de anticuerpos de la invención es otro procedimiento preferido de tratamiento. Este procedimiento de inmunización pasiva es particularmente útil para niños recién nacidos o para mujeres embarazadas. Este procedimiento típicamente usará anticuerpos monoclonales, que estarán humanizados o serán completamente humanos. Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. El suministro directo puede conseguirse por inyección parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, o al espacio intersticial de un tejido), o por administración rectal, oral (por ejemplo, comprimido, aerosol), vaginal, tópica, transdérmica, transcutánea, intranasal, sublingual, ocular, al oído, pulmonar u otra administración a la mucosa. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o el brazo. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero puede usarse eyección sin aguja como

alternativa. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

La invención puede usarse para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa. Preferiblemente, la inmunidad sistémica y/o mucosa potenciada se refleja en una respuesta inmune TH1 y/o TH2 potenciada. Preferiblemente, la respuesta inmune potenciada incluye un aumento en la producción de IgG1 y/o IgG2a y/o IgA.

5 El tratamiento de dosis puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede estar seguido de un programa de dosis de refuerzo. En un programa de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por la misma o por diferentes vía, por ejemplo, sensibilización parenteral y refuerzo en la mucosa, sensibilización a la mucosa y refuerzo parenteral, etc. La coordinación adecuada entre las dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre la sensibilización y el refuerzo, pueden determinarse rutinariamente. Por ejemplo, el ciclo principal de vacunación puede incluir 1-10 dosis diferentes, seguido de otras dosis administradas a intervalos posteriores de tiempo necesarios para mantener y/o reforzar una respuesta inmune, por ejemplo, a los 1-4 meses para una segunda dosis, y si fuera necesario, una o más dosis posteriores después de varios meses.

15 Las infecciones bacterianas afectan a diversas áreas del cuerpo y por tanto pueden prepararse composiciones en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse en forma de inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de su inyección (por ejemplo, una composición liofilizada o secada por pulverización-congelación). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, en forma de una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, en forma de un comprimido o cápsula, en forma de un aerosol o en forma de un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, en forma de un inhalador, usando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse en forma de un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, al oído u ocular, por ejemplo, en forma de aerosol, gotas, gel o polvo [por ejemplo, ref. 161 y 20 162]. La composición puede estar en forma de kit, diseñado de modo que se reconstituya una composición combinada justo antes de su administración a un paciente. Dichos kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados.

Las composiciones de la invención pueden administrarse a los pacientes en sustancialmente el mismo momento que (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional sanitario) otras vacunas, por ejemplo, en sustancialmente el mismo momento que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una 30 vacuna contra la rubéola, una vacuna contra MIVm, una vacuna contra la varicela, una vacuna contra MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra pertussis, una vacuna DTP, una vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b, una vacuna contra el virus del papiloma humano, una vacuna inactivada contra poliovirus, una vacuna contra el virus de la hepatitis B, una vacuna conjugada contra neumococos, una 35 vacuna conjugada contra meningococos, etc. Asimismo, pueden administrarse a pacientes en sustancialmente el mismo momento que (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional sanitario) un antibiótico, y en particular un compuesto antibiótico activo contra UPEC.

Componentes antigénicos adicionales de composiciones de la presente invención

La invención también proporciona una composición que comprende un polipéptido de la invención y uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- un antígeno sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y (preferiblemente los cuatro), tal como el oligosacárido descrito en la ref. 163 del serogrupo C [véase también la ref. 164] o los oligosacáridos de la ref. 165.
- un antígeno de *N. meningitidis* serogrupo B tal como los descritos en las ref. 166-174, etc.
- 45 - un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 175, 176, 177].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como el virus inactivado [por ejemplo, 178, 179].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ejemplo, 179, 180].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo, 181].
- un antígeno del VIH [182].
- 50 - un antígeno de difteria, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 3 de la ref. 183], por ejemplo, el mutante CRM197 [por ejemplo, 184].
- un antígeno de tétanos, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de la ref. 183].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, ref. 185 y 186].
- 55 - un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, 164].
- antígeno(s) de polio [por ejemplo, 187, 188] tal como IPV.
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubéola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la ref. 183].
- antígenos de varicela.
- 60 - antígeno(s) de influenza [por ejemplo, capítulo 19 de la ref. 183], tal como las proteínas de superficie

hemaglutinina y/o neuraminidasa. Los antígenos de influenza pueden obtenerse de cepas de flu interpandémicas (anuales). Los antígenos de influenza pueden obtenerse de cepas con el potencial de causar un brote pandémico (es decir, cepas de influenza con nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina de las cepas en circulación en ese momento, o cepas de influenza que son patogénicas en sujetos aviares y tienen el potencial de transmitirse horizontalmente en la población humana, o cepas de influenza que son patogénicas para los seres humanos). Los antígenos de influenza pueden obtenerse de virus cultivados en huevos o cultivo celular.

- 5 - un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 189].
- un antígeno sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos grupo B).
- 10 - un antígeno proteico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos grupo B) [por ejemplo, 190-195].
- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo, 196-199].
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, ref. 200 a 206] o una combinación de antígenos de *C. pneumoniae* [por ejemplo, 207].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis*, o una combinación de antígenos de *C. trachomatis* [por ejemplo, 208].
- 15 - un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 209].
- antígeno(s) de la rabia [por ejemplo, 210] tal como virus inactivado liofilizado [por ejemplo, 211, RabAvert™].
- antígeno(s) de un paramixovirus tal como el virus sincitial respiratorio (RSV [212, 213]) y/o el virus de la parainfluenza (PIV3 [214]).
- un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo 215, 216, 217].
- 20 - un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos grupo A) [por ejemplo, 191, 218, 219].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 220].
- un antígeno de un virus de la familia flaviviridae (género flavivirus), tal como del virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, cuatro serotipos de virus del Dengue, el virus de la encefalitis transmitida por garrapata, el virus del Nilo Occidental.
- 25 - un antígeno de pestivirus, tal como del virus de la fiebre porcina clásica, el virus de la diarrea vírica bovina, y/o el virus de la enfermedad de la frontera.
- un antígeno de parvovirus, por ejemplo, de parvovirus B19.
- un antígeno del virus del papiloma humano (VPH) [221].

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

- 30 En otra realización, los antígenos de la invención se combinan con uno o más antígenos no *E. coli* adicionales adecuados para su uso en una vacuna diseñada para proteger a las mujeres contra enfermedades genitourinarias y/o transmitidas por vía sexual. Por ejemplo, los antígenos pueden combinarse con un antígeno derivado del grupo compuesto por *Streptococcus agalactiae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, papilomavirus y virus del herpes simple. Cuando se usan antígenos del virus del papiloma humano, pueden estar en forma de uno o más de
- 35 VPH 16, VPH 18, VPH 6 y/o VPH 11.

Los antígenos de gonococos preferidos incluyen uno o más de ngs13 (OmpA), OmpH, ngs576 (proteína peptidil-prolil cis/trans isomerasa (PPiase)), ngs41 y ngs117.

Los antígenos de VPH preferidos incluyen uno o más de VPH 16, VPH 18, VPH 6 y VPH 11.

- 40 Los antígenos preferidos de *Chlamydia trachomatis* incluyen uno o más de: CT045, CT089, CT242, CT316, CT331, CT396, CT398, CT444, CT467, CT547, CT587, CT823, CT761 y combinaciones específicas de estos antígenos como se describe en el documento WO ops/002619.

- 45 Los antígenos preferidos de *Chlamydia pneumoniae* incluyen uno o más de: CPn0324, Cpn0301, Cpn0482, Cpn0503, Cpn0525, Cpn0558, Cpn0584, Cpn0800, Cpn0979, Cpn0498, Cpn0300, Cpn0042, Cpn0013, Cpn450, Cpn0661, Cpn0557, Cpn0904, Clpn0795, Cpn0186 y Cpn0604 y combinaciones específicas de estos antígenos como se describe en el documento WO 05/084306. Los antígenos GBS preferidos incluyen uno o más de GBS80, GBS 104, GBS 59, GBS 67, GBS 322 y GBS 276.

- 50 En otra realización, las combinaciones de antígenos de la invención se combinan con uno o más antígenos no ExPEC adicionales adecuados para su uso en una vacuna diseñada para proteger a individuos ancianos o inmunocomprometidos. Por ejemplo, las combinaciones de antígenos pueden combinarse con un antígeno derivado del grupo compuesto por *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, el virus de la influenza, y el virus de la parainfluenza ('VPI').

Los antígenos proteicos tóxicos pueden detoxificarse cuando sea necesario (por ejemplo, detoxificación de la toxina pertussis por medios químicos y/o genéticos [186]).

- 55 Cuando se incluye un antígeno diftérico en la composición, se prefiere incluir también antígeno tetánico y antígenos de pertussis. Asimismo, cuando se incluye un antígeno tetánico, se prefiere incluir también antígenos diftéricos y de pertussis. Asimismo, cuando se incluye un antígeno de pertussis, se prefiere incluir también antígenos diftéricos y tetánicos. Por tanto se prefieren combinaciones DTP.

5 Los antígenos sacáridos están preferiblemente en forma de conjugados. Las proteínas vehículo para los conjugados incluyen toxinas bacterianas (tales como toxoide diftérico o toxoide tetánico), la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [222], péptidos sintéticos [223, 224], proteínas de choque térmico [225, 226], proteínas de pertussis [227, 228], la proteína D de *H. influenzae* [229, 230], citoquinas [231], linfoquinas [231], proteínas de *H. influenzae*, hormonas [231], factores de crecimiento [231], toxina A o B de *C. difficile* [232], proteínas de captación de hierro [233], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopes de células T CD4⁺ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [234] tales como la proteína N19 [235], la proteína de superficie PspA de neumococos [236], neumolisina [237], etc. Una proteína vehículo preferida es la proteína CRM197 [238].

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

Los antígenos preferiblemente se adsorben en una sal de aluminio.

15 El suministro de ADN usando micropartículas de PLG {poli(lactida-co-glicolida)} es un procedimiento particularmente preferido, por ejemplo, por adsorción a las micropartículas, que se tratan opcionalmente para que tengan una superficie cargada negativamente (por ejemplo, tratada con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, tratada con un detergente catiónico, tal como CTAB).

General

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

20 El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

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

25 Los restos N-terminales en las secuencias de aminoácidos de la lista de secuencias se dan como el aminoácido codificado por el primer codón en la secuencia de nucleótidos correspondiente. Cuando el primer codón no es ATG, se entenderá que se traducirá como metionina cuando el codón es un codón de inicio, pero se traducirá como el aminoácido no Met indicado cuando la secuencia está en el extremo C de un compañero de fusión. La invención describe y abarca específicamente cada una de las secuencias de aminoácidos de la lista de secuencias que tienen un resto de metionina N-terminal (por ejemplo, un resto de formil-metionina) en lugar de cualquier resto no Met indicado. También describe y abarca específicamente cada una de las secuencias de aminoácidos de la lista de secuencias que empiezan en cualquier resto de metionina interno en las secuencias.

Como se indica en el texto anterior, los polipéptidos de la invención pueden incluir secuencias que:

- (a) son idénticas (es decir, 100% idénticas a las secuencias descritas en la lista de secuencias;
- 35 (b) comparten identidad de secuencia con las secuencias descritas en la lista de secuencias;
- (c) tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 alteraciones sencillas de nucleótidos o aminoácidos (deleciones, inserciones, sustituciones), que pueden estar en localizaciones separadas o puede ser contiguas, en comparación con las secuencias de (a) o (b); y
- 40 (d) cuando se alinean con una secuencia particular de la lista de secuencias usando un algoritmo de alineación por pares, una ventana móvil de x monómeros (aminoácidos o nucleótidos) que se mueve desde el inicio (extremo N o 5') hasta el final (extremo C o 3'), de modo que para una alineación que se extiende hasta p monómeros (donde $p > x$) existen $p-x+1$ de dichas ventanas, cada ventana tiene al menos x-y monómeros alineados idénticos, donde: x se selecciona entre 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200; y se selecciona entre 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; y
- 45 si x-y no es un número entero, entonces se redondea hasta el número entero más cercano. El algoritmo de alineación por pares preferido es el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch [294], usando parámetros por defecto (por ejemplo, con penalización por abertura de hueco = 10,0, y con penalización por extensión de hueco = 0,5, usando la matriz de valores EBLOSUM62). Este algoritmo se implementa convenientemente en la herramienta de aguja del paquete EMBOSS [295].

50 Los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención pueden tener adicionalmente secuencias adicionales en el extremo N/5' y/o el extremo C/3' de estas secuencias (a) a (d).

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique otra cosa, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, las referencias 296-303, etc.

EXPERIMENTAL

A continuación hay ejemplos de realizaciones específicas o modos de realizar la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente para propósitos ilustrativos.

5 Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debe permitirse algo de error y desviación experimental, por supuesto.

Modos de realizar la invención

10 Se usaron herramientas comparativas y predictivas basadas en ordenador para identificar 596 polipéptidos que son (a) habituales en al menos dos cepas UPEC pero no se encuentran en cepas no patogénicas, y están (b) asociados a superficie o membrana. Estos 596 polipéptidos y sus secuencias de aminoácidos están en la lista de secuencias como SEC ID N° 1 a 596. La tabla 1 proporciona los números de acceso 'gi' (GenInfo Identifier) para la SEC ID N° 577 [11], y esta información puede usarse para recuperar información que incluye (a) el registro de la base de datos de secuencia completa para el polipéptido y (b) la secuencia codificante correspondiente del genoma de *E. coli*. Por ejemplo, el sistema NCBI Entrez [304] puede consultarse con '26111674' para dar un único registro [305], y el enlace 'CDS' en ese registro puede pincharse para revelar la secuencia codificante correspondiente [306].

15 Como las secuencias polipeptídicas de este documento ya están disponibles en bases de datos públicas, también están disponibles sus funciones anotadas. Algunos de los 596 polipéptidos no tienen función reconocida en la anotación actual (por ejemplo, están anotadas en las bases de datos como 'proteína hipotética'). Aunque los inventores no han dilucidado la función biológica básica subyacente de estos polipéptidos, la invención ahora proporciona una utilidad creíble para los polipéptidos de la invención, concretamente la provisión de composiciones inmunogénicas como se describe en este documento.

20

La tabla 2 presenta las coincidencias más cercanas a la SEC ID N° 577 en las secuencias K12 no patogénicas para las cepas MG1655 [307], W3110 y DH10B.

25 La tabla 3 muestra los 414/596 polipéptidos con las coincidencias más fuertes entre dos genomas UPEC diferentes, siendo los números de SEC ID subrayados aquellos con una conservación del 100%. Los 182 polipéptidos restantes están más débilmente conservados entre las cepas UPEC, y por tanto se prefieren los polipéptidos de la tabla (particularmente los subrayados). De las 596 secuencias, se seleccionaron 156 en preferencia (por ejemplo, SEC ID N° 577 de la tabla 2).

30 Estos polipéptidos se clonan, expresan y purifican. Los antígenos purificados se usan para inmunizar ratones, cuyos sueros se analizan por transferencia de Western, ELISA y FACS, y se ensayan adicionalmente en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los experimentos *in vitro* adecuados incluyen el ensayo de la capacidad de los anticuerpos de inducir eliminación bacteriana mediada por el complemento y/o actividad de opsonofagocitosis, de bloquear la unión de cepas ExPEC (o el antígeno purificado) a células epiteliales humanas (por ejemplo, en células de vejiga) u otras líneas celulares, y/o de inhibir la adhesión/invasión de bacterias *E. coli* (por ejemplo, cepa K1) a células del endotelio microvascular del cerebro (BMEC). Los experimentos *in vivo* adecuados incluyen

35 inmunizaciones sistémicas activas y/o pasivas y exposición en modelos de ratón de ITU (ratones adultos), protección por inmunizaciones activas o pasivas contra bacteremia y meningitis en ratas de 5 días de edad expuestas con la cepa K1 de *E. coli*, e inmunización e infección intraperitoneal de ratones adultos con una cepa ExPEC.

40 La importancia de las proteínas para el ciclo de vida bacteriano se ensaya creando mutantes knockout isogénicos. Los mutantes también pueden usarse para asegurar que los sueros producidos por un antígeno son específicos para ese antígeno. Se usan microseries para estudiar los patrones de expresión. La conservación y/o variabilidad se evalúa secuenciando los genes de múltiples cepas ExPEC diferentes.

Se realizaron ensayos para seleccionar proteínas expuestas en superficie predichas, que son específicas para cepas UPEC y ausentes en cepas no patogénicas (cepas comensales y de laboratorio). Una vez seleccionadas, estas proteínas se expresan y purifican y usan para inmunizar ratones.

45 Se sabe, a partir de la referencia 43, que una mutación en cualquiera de los genes *tol-pal* de *E. coli* provoca la formación de vesículas que contienen proteínas de nativas de membrana externa. Comparando las proteínas presentes en las vesículas de cepas UPEC y cepas no patogénicas, es posible seleccionar un pequeño grupo de proteínas que podría usarse como antígenos potenciales.

Manipulación genética mediada por Lambda red en E. coli comensal y patogénica

50 Este procedimiento es un procedimiento rápido basado en PCR usado para inactivar el gen *tolR* de las cepas de tipo silvestre de *E. coli* [308]. En resumen, la primera etapa consiste en amplificar independientemente las regiones cadena arriba y cadena abajo del gen diana (*tolR*) y el casete marcador de resistencia. Los dos productos de PCR obtenidos en la etapa 1 se mezclan con el producto de amplificación del casete AB a concentraciones equimolares y se somete a una segunda ronda de PCR (una PCR a tres bandas) para generar un casete marcador de resistencia flanqueado por regiones cadena arriba y cadena debajo de 500 pb (o más) homólogas al gen diana. En la tercera

55

etapa, se someten a electroporación grandes cantidades (1 µg) del ADN lineal deseado en células lambda-red competentes.

Preparación del vehículo

1. Preparación del vehículo por precipitación con TCA

5 Se inoculó medio LB con bacterias cultivadas en placas y se incubó durante una noche a 37°C con agitación suave. El cultivo se usó para inocular 200 ml de LB a DO600 0,1. Las bacterias se cultivaron a DO600 0,4 (o según se especifique). El cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 4000 x g y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 mm para retirar las bacterias residuales.

10 También se realizaron los mismos experimentos en condiciones limitantes de hierro añadiendo Dipiridilo (0,25 M) al medio LB.

La precipitación se realizó añadiendo al sobrenadante de cultivo al 10% final de una solución al 100% (p/v) de TCA, desoxicolato al 0,4% (p/v). La precipitación se dejó proceder durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se recuperó por 10 minutos de centrifugación a 20000 x g a 4°C. El sedimento se lavó una vez con TCA al 10% (p/v) y dos veces con etanol absoluto. El sedimento se secó con una speed vac, y se almacenó a -20°C.

15 Las cepas de tipo silvestre y mutadas se sometieron a electroforesis en gel de SDS poliacrilamida a partir del cual pudo observarse que había muchas más bandas en el sobrenadante de las cepas mutadas que en el de las cepas de tipo silvestre. Bandas picadas aleatoriamente demostraron que todas las proteínas del sobrenadante eran proteínas de membrana.

2. Preparación de vesículas por ultracentrifugación

20 El sobrenadante de cultivo se ultracentrifugó a 200000 x g durante 2 horas a 4°C. El sedimento se lavó con PBS, se resuspendió en PBS, y se almacenó a -20°C.

3. Desnaturalización con guanidinio de las vesículas

25 Antes de la desnaturalización con guanidinio, las vesículas se precipitaron con etanol. Se precipitaron 10 µg de OMV en PBS añadiendo etanol absoluto frío al 90% final. La precipitación se dejó proceder durante 20 minutos a -20°C. El precipitado se recuperó por 10 minutos de centrifugación a 13000 x g. El sedimento se resuspendió con 50 ml, guanidinio 6 M, DTT 15 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,0. La desnaturalización se dejó proceder durante 60 minutos a 60°C. Antes de la digestión, la solución se diluyó 1/8 con una solución de Tris 1,5 M pH 8,0 y se añadieron 5 mg de tripsina a la solución diluida. La digestión se dejó proceder durante una noche a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo un 0,1% final de ácido fórmico. Los péptidos se extrajeron usando cartuchos de extracción Oasis. Los péptidos se analizaron por EM-EM acoplada a CL.

4. Digestión superficial

35 Se añadieron 5 mg de tripsina a 10 mg de vesículas en PBS y se incubaron a 37°C durante 3 horas. La reacción se detuvo añadiendo un 0,1% final de ácido fórmico. Los péptidos se recuperaron por filtración a través de un filtro de 30 Kda de punto de corte y se extrajeron con cartucho de extracción Oasis. Los péptidos se analizaron con EMEM acoplada a CL.

ANÁLISIS DE VESÍCULAS

Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron con el procedimiento de Bradford, usando BSA como patrón.

SUDS PAGE

40 Las muestras se analizaron con un gel de poliacrilamida al 4-12% con dodecil sulfato sódico (SDS), usando un aparato de electroforesis Mini-Protean II. Las muestras se suspendieron en tampón de muestra SDS (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, glicerol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v), 2-mercaptoetanol al 5% (v/v), 10 mg/ml de azul de bromofenol) y se calentaron a 100°C durante 5 min. antes de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Después del procesamiento, los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

Espectrometría de masas MALDI-TOF

45 Las bandas de proteínas o manchas se escindieron de los geles, se lavaron con bicarbonato de amonio 50 mM/acetoneitrilo (50/50, v/v), y se secaron con una centrífuga Speed-Vac (Savant). Las manchas secadas se digirieron a 37°C durante 2 h añadiendo de 7 a 1,0 ml de una solución que contenía bicarbonato de amonio 5 mM, 0,012 mg de tripsina de calidad de secuenciación. Después de la digestión, se cargaron 0,6 ml en una matriz de diana pre-detectada y secada al aire. Las manchas se lavaron con 0,6 ml de una solución de etanol al 70%, ácido

50

trifluoroacético al 0,1%. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas MALDI TOF ultraflex. Los espectros se calibraron externamente usando una combinación de patrones pre-detectados en la diana. La identificación de proteínas se realizó por comparaciones tanto automáticas como manuales de picos monoisotópicos generados experimentalmente de péptidos en el intervalo de masa de 700 a 3.000 Da con huellas generadas por ordenador, usando el programa Mascot.

Electroforesis bi-dimensional

Se resuspendieron 200 mg de vesículas en una solución de re-hinchamiento Immobiline (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2% (p/v), ASB14 al 2% (p/v), tampón IPG al 2% (v/v) pH 3-10 NL, TBP 2 mM, DTT 65 mM), y se adsorbieron durante una noche en Immobiline DryStrips de 7 cm (pH 3-10 NL). Las proteínas después se separaron por electroforesis 2D. La primera dimensión se procesó usando una Unidad de Enfoque Isoeléctrico IPGphor, aplicando secuencialmente 150 V durante 35 minutos, 500 V durante 35 minutos, 1.000 V durante 30 minutos, 2.600 V durante 10 minutos, 3.500 V durante 15 minutos, 4.200 V durante 15 minutos, y finalmente 5.000 V hasta alcanzar 10 kVh. Para la segunda dimensión, las tiras se equilibraron mediante dos incubaciones de 10 minutos en urea 4 M, tiourea 2 M, glicerol al 30%, SDS al 2%, TBP 5 mM, Tris HCl 50 Mm pH 8,8, acrilamida al 2,5%, azul de bromofenol al 0,2%. Las proteínas después se separaron en geles de poli(acrilamida) premoledados lineales del 4-12%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal y se analizaron con un Densitómetro Personal SI. Las imágenes se analizaron con el software Image Master 2D Elite.

Nano-CL/EM/EM

Los péptidos se separaron por nano-CL en un sistema de HPLC CapLC conectado a un espectrómetro de masas Q-ToF Micro ESI equipado con una fuente de nanopulverización. Las muestras se cargaron en una columna Atlantis C18 NanoEase (100 μ m d.i. x 100mm), a través de una columna de retención C18 (300 μ m d.i. x 5 mm). Los péptidos se eluyeron con un gradiente durante 50 min. del 2% al 60% de ACN al 95%, en una solución de ácido fórmico al 0,1% a un caudal de 400 nl/minuto. Los péptidos eluidos se sometieron a un programa de adquisición dependiente de datos automatizado, usando el software MassLynx, versión 4,0, donde se usó un escáner de análisis de EM para seleccionar automáticamente péptidos multi-cargados sobre el intervalo m/z de 400-2.000 para fragmentación adicional por EM/EM. Hasta tres diferentes componentes se sometieron a fragmentación por EM/EM al mismo tiempo. Después de la adquisición de datos, se combinaron los espectros individuales de EM/EM, se suavizaron y se determinaron los centroides por MassLynx. La búsqueda e identificación de los péptidos se realizó en modo discontinuo con una versión con licencia de MASCOT. Los parámetros de búsqueda de MASCOT fueron: (1) especie: ExPEC (2) número permitido de escisiones perdidas (solamente para digestión con tripsina): 6; (3) modificaciones post-traduccionales variables: oxidación de metionina; (4) tolerancia de péptidos: \pm 500 ppm; (5) tolerancia de EM/EM: \pm 0,3 Da y (6): carga de péptido: de +1 a +4. En cuando a la plataforma previa, se consideraron solamente los aciertos significativos definidos por el análisis de probabilidades MASCOT. Los umbrales de valoración para la aceptación de identificaciones de proteínas a partir de al menos un péptido se establecieron por MASCOT como 18 para digestión con tripsina y 36 para digestión con proteinasa K.

ANÁLISIS DE ANTÍGENOS

Modelo de ratón de infección sistémica

Para explorar una gran cantidad de antígenos seleccionados por análisis comparativo de genomas entre cepas patogénicas y no patogénicas de *E. coli*, se ha establecido un modelo de protección basado en un ensayo de virulencia clásico. Los modelos experimentales alternativos que también pueden usarse incluyen los resumidos en las referencias 158, 159 y 160.

El modelo experimental (inmunización e infección) usa ratones exogámicos CD1 de 5 semanas de edad que se exponen con inoculación intraperitoneal de la cepa virulenta CFT073 de *E. coli*. La dosis de exposición se ha determinado experimentalmente como la cantidad de bacterias capaz de eliminar el 80% de los ratones adultos en 72 horas y corresponde a 7×10^7 ufc/ratón para la cepa CFT073.

Protocolo de inmunización

Los ratones se inmunizan tres veces por inyección subcutánea de 150 μ l de solución proteica usando adyuvante de freund como se muestra en la siguiente tabla:

	Ratones de control:	Ratones inmunizados:
Día 0	75 μ l de solución salina 75 μ l de adyuvante completo de freund	75 μ l de solución proteica (20 μ g) 75 μ l de adyuvante completo de freund
Día 21	75 μ l de solución salina 75 μ l de adyuvante incompleto de freund	75 μ l de solución proteica (20 μ g) 75 μ l de adyuvante incompleto de freund
Día 35	75 μ l de solución salina 75 μ l de adyuvante incompleto de freund	75 μ l de solución proteica (20 μ g) 75 μ l de adyuvante incompleto de freund

Se recogen muestras de sangre el día antes de la primera inmunización (suero preinmune), en el día 34 y 48 (día antes de la exposición). Los sueros de los animales inmunizados se ensayan por transferencia de western y ELISA para determinar los títulos de anticuerpo.

Exposición

5 En el día 48 la cepa CFT073 de *E. coli* se siembra en estrías en una placa de agar LB a partir de una solución madre congelada y se incuba durante una noche (DN) a 37°C en una incubadora. En el día 49 el cultivo en placa DN se usa para inocular 50 ml de medio LB para que tenga una D.O.₆₀₀ = 0,1, y se cultiva durante 1,5 horas a 37°C en agitación hasta que el cultivo bacteriano alcanza una D.O.₆₀₀ = 0,6 que corresponde a 7×10^8 ufc/ml para la cepa CFT073. El cultivo se centrifuga y el sedimento se resuspende en el mismo volumen con solución fisiológica y se usa para exposición sin diluir. El cultivo se siempre en placas usando un procedimiento de recuento de placas convencional para verificar el inóculo. Se inyectan 100 µl de la suspensión celular que contiene 7×10^7 bacterias CFT073 por vía intraperitoneal, usando una jeringa de 1 ml, a ratones de control e inmunizados. Se registra el número de muertes en cada grupo de animales a las 24, 48 y 72 horas después de la infección.

15 La protección debido a la vacunación se evalúa por comparación de la supervivencia en el grupo vacunado y la supervivencia en el grupo de control de ratones a las 72 horas desde la exposición. El porcentaje de supervivencia relativa a los controles se calcula usando la fórmula:

$$\frac{\text{tasa de supervivencia en el grupo vacunado}}{\text{tasa de supervivencia en el grupo de control}}$$

tasa de supervivencia en el grupo de control

RESULTADOS

20 La inmunización se realizó con CFT073 inactivada por calor. Como puede observarse en la Figura 1, el porcentaje de supervivencia de los ratones después de la exposición con CFT073 se aumentó después de la inmunización con CFT073 inactivada por calor.

Estudios de inmunización

25 Los antígenos se seleccionan para combinarlos para dar una composición de la invención. Se dividen ratones BALB/c en nueve grupos y se inmunizan del siguiente modo:

Grupo	Composición inmunizante	Vía de administración
1	Mezcla de antígenos (10-20 µg proteína/cada uno) + CFA (adyuvante completo de Freund)	Intraperitoneal o intranasal o subcutánea
2	Mezcla de antígenos (5 µg/cada uno) + hidróxido de Al (200 µg)	Intraperitoneal o intranasal o subcutánea
3	Mezcla de antígenos (10-20 µg proteína/cada uno) + CpG (10 µg)	Intraperitoneal o intranasal o subcutánea
4	Mezcla de antígenos (10-20 µg proteína/cada uno) + hidróxido de Al (200 µg) + CpG (10 µg)	Intraperitoneal o intranasal o subcutánea
5	CFA	Intraperitoneal o intranasal o subcutánea
6	Mezcla de antígenos (10-20 µg proteína/cada uno) + LTK63 (5 µg)	Intraperitoneal o Intranasal o subcutánea
7	Hidróxido de Al (200 µg) + CpG (10 µg)	Intraperitoneal o intranasal o subcutánea
8	CpG (10 µg)	Intraperitoneal o intranasal o subcutánea
9	LTK63 (5 µg)	Intraperitoneal o intranasal o subcutánea

30 Los ratones se inmunizan a intervalos de dos semanas. De dos a tres semanas después de la última inmunización, todos los ratones se exponen con la cepa UPEC apropiada. Cuando se usa inmunización a la mucosa (por ejemplo, intranasal), el modelo animal también se expone por vía mucosa para ensayar el efecto protector del inmunógeno mucoso. Inmediatamente antes de la exposición, se extrae sangre de los ratones para determinar el título de anticuerpos contra los antígenos que se administraron.

Para la exposición a ratones, se cultivarán bacterias virulentas en medios apropiados. Las bacterias se recogen por centrifugación, se resuspenden, y se diluyen en serie para el inóculo de exposición. Se exponen ratones BALB/c y se observan diariamente durante 30 días después de la exposición.

5 Puede medirse la IgG total y los subtipos IgG1/IgG2A en los sueros de ratón resultantes de los diferentes regímenes de inmunización usando un ensayo ELISA sobre bacterias completas y sobre proteínas recombinante purificadas. Además, la evaluación de células Th CD4⁺ y CD8⁺ específicas de antígeno en células esplénicas y/o PBMC aisladas de ratones inmunizados puede realizarse por análisis FACS de múltiples parámetros, para evaluar los perfiles de expresión de citoquinas de células T específicas de antígeno. En particular, la producción de IFN- γ e IL-5 puede medirse después de estimulación *in vitro* de células T con antígenos purificados. Además, pueden recogerse
10 esplenocitos y/o PBMC de ratones inmunizados con cada formulación de antígeno/vacuna 10-12 días después de la última dosis de inmunización y estimularse con bacterias UPEC. Después de 4 horas de estimulación, se añade Brefeldina A a las células durante las siguientes 12 horas, para bloquear la secreción de citoquinas. Después de ello, las células se fijan y tiñen con anticuerpos para detectar células T específicas de UPEC que expresan IFN- γ e IL-5.

15 Las células T pueden aislarse de linfocitos de sangre periférica (PBL) por una diversidad de procedimientos conocidos para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, las poblaciones de células T pueden "enriquecerse" a partir de una población de PBL a través de la eliminación de las células accesorias y B. En particular, el enriquecimiento de células T puede realizarse por la eliminación de células no T usando anticuerpos monoclonales anti-MHC clase II. Asimismo, pueden usarse otros anticuerpos para eliminar poblaciones específicas de células no T. Por ejemplo, pueden usarse moléculas de anticuerpo anti-Ig para eliminar las células B y moléculas de anticuerpo anti-Mac1 para eliminar los macrófagos.
20

Las células T pueden fraccionarse adicionalmente en varias subpoblaciones diferentes por técnicas conocidas para los especialistas en la técnica. Pueden aislarse dos subpoblaciones principales en base a su expresión diferencial de los marcadores de superficie celular CD4 y CD8. Por ejemplo, después del enriquecimiento de células T como se ha descrito anteriormente, pueden enriquecerse las células CD4⁺ usando anticuerpos específicos para CD4. Los anticuerpos pueden acoplarse a un soporte sólido tal como perlas magnéticas. A la inversa, pueden enriquecerse las células CD8⁺ a través del uso de anticuerpos para CD4 (para retirar las células CD4⁺), o pueden aislarse por el uso de anticuerpos CD8 acoplados a un soporte sólido. Los linfocitos CD4 de pacientes infectados con UPEC pueden expandirse *ex vivo*, antes o después de la transducción.
25

Después de la purificación de las células T, las células T purificadas se pre-estimulan con diversas citoquinas incluyendo, aunque sin limitación rIL-2, IL-10, IL-12, e IL-15, que promueven el crecimiento y la activación de los linfocitos.
30

Las células T específicas de UPEC pueden activarse por los polipéptidos inmunogénicos descritos anteriormente. Las células T específicas de UPEC pueden ser CD8⁺ o CD4⁺. Las células T CD8⁺ específicas de UPEC pueden ser linfocitos T citotóxicos (CTL) que pueden eliminar las células infectadas con UPEC que presentan alguno de los polipéptidos descritos anteriormente o fragmentos de los mismos en complejo con una molécula MHC clase I. Pueden detectarse células T CD8⁺ específicas de Chlamydia por, por ejemplo, ensayos de liberación de ⁵¹Cr. Los ensayos de liberación de ⁵¹Cr miden la capacidad de las células T CD8⁺ específicas de UPEC de lisar células diana presentando uno o más de estos epítopes. Las células T CD8⁺ específicas de UPEC que expresan antígenos antivirales, tales como IFN γ , también se contemplan en este documento y también pueden detectarse por procedimientos inmunológicos, preferiblemente por tinción intracelular para IFN- γ o citoquinas afines después de estimulación *in vitro* con uno o más de los polipéptidos UPEC descritos anteriormente. Las células T CD4⁺ específicas de UPEC pueden detectarse por un ensayo de linfoproliferación. Los ensayos de linfoproliferación miden la capacidad de las células T CD4⁺ específicas de UPEC de proliferar en respuesta a uno o más de los polipéptidos descritos anteriormente.
35
40

45

TABLA 1 - Una secuencia de *E. coli* patogénica
gi-26111597 (SEC ID N° 577)

TABLA 2 - Aciertos K12

SEC ID	K12			JW3110			DH10B		
	valor e	solap.	% id	valor e	solap.	% id	valor e	solap.	% id
577	3.E47	107/304	35	3.E-47	107/304	35	5.E-47	107/304	35

TABLA 3 - SEC ID N° con los aciertos más potentes inter-UPEC

1	3	4	6	7	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	2
<u>24</u>	<u>33</u>	<u>34</u>	<u>35</u>	<u>37</u>	<u>41</u>	<u>42</u>	<u>44</u>	<u>45</u>	<u>46</u>	<u>47</u>	<u>48</u>	<u>50</u>	<u>51</u>	<u>50</u>	<u>52</u>
<u>54</u>	<u>55</u>	<u>56</u>	<u>57</u>	<u>58</u>	<u>60</u>	<u>61</u>	<u>62</u>	<u>63</u>	<u>64</u>	<u>65</u>	<u>67</u>	<u>68</u>	<u>69</u>	<u>70</u>	<u>71</u>
<u>72</u>	<u>73</u>	<u>75</u>	<u>82</u>	<u>87</u>	<u>96</u>	<u>97</u>	<u>99</u>	<u>100</u>	<u>101</u>	<u>106</u>	<u>110</u>	<u>111</u>	<u>114</u>	<u>115</u>	<u>116</u>
117	<u>118</u>	119	120	<u>121</u>	122	<u>123</u>	<u>124</u>	<u>125</u>	<u>126</u>	<u>127</u>	<u>128</u>	<u>129</u>	<u>130</u>	<u>131</u>	132
<u>133</u>	<u>134</u>	<u>135</u>	<u>136</u>	<u>137</u>	<u>140</u>	<u>142</u>	151	152	154	<u>156</u>	157	<u>158</u>	<u>160</u>	<u>162</u>	169
<u>175</u>	<u>176</u>	<u>177</u>	<u>180</u>	<u>182</u>	<u>184</u>	<u>185</u>	<u>186</u>	<u>187</u>	<u>188</u>	<u>189</u>	<u>190</u>	<u>191</u>	<u>192</u>	<u>194</u>	<u>195</u>
<u>196</u>	<u>201</u>	<u>203</u>	<u>204</u>	<u>205</u>	<u>208</u>	<u>209</u>	<u>210</u>	<u>211</u>	<u>212</u>	<u>214</u>	<u>215</u>	<u>216</u>	<u>219</u>	<u>220</u>	<u>221</u>
<u>222</u>	<u>223</u>	<u>224</u>	<u>225</u>	<u>227</u>	<u>230</u>	<u>232</u>	<u>233</u>	<u>234</u>	<u>235</u>	<u>236</u>	<u>237</u>	<u>238</u>	<u>239</u>	<u>241</u>	<u>242</u>
<u>243</u>	<u>244</u>	<u>245</u>	<u>246</u>	<u>247</u>	<u>248</u>	<u>249</u>	<u>250</u>	<u>251</u>	<u>252</u>	<u>253</u>	<u>254</u>	<u>255</u>	<u>256</u>	<u>257</u>	<u>258</u>
<u>259</u>	<u>261</u>	<u>262</u>	<u>263</u>	<u>264</u>	<u>265</u>	<u>266</u>	<u>268</u>	<u>269</u>	<u>270</u>	<u>271</u>	<u>272</u>	<u>273</u>	<u>274</u>	<u>275</u>	<u>276</u>
<u>278</u>	<u>279</u>	<u>280</u>	<u>281</u>	<u>283</u>	<u>285</u>	<u>286</u>	<u>288</u>	<u>291</u>	<u>295</u>	<u>296</u>	<u>298</u>	<u>299</u>	<u>300</u>	<u>301</u>	<u>302</u>
<u>303</u>	<u>304</u>	<u>305</u>	<u>307</u>	<u>308</u>	<u>310</u>	<u>311</u>	<u>312</u>	<u>314</u>	<u>316</u>	<u>318</u>	<u>325</u>	<u>326</u>	<u>327</u>	<u>329</u>	<u>330</u>
<u>331</u>	<u>332</u>	<u>334</u>	<u>335</u>	<u>336</u>	<u>340</u>	<u>341</u>	<u>342</u>	<u>343</u>	<u>344</u>	<u>345</u>	<u>346</u>	<u>347</u>	<u>349</u>	<u>350</u>	<u>351</u>
<u>352</u>	<u>353</u>	<u>354</u>	<u>355</u>	<u>357</u>	<u>358</u>	<u>360</u>	<u>361</u>	<u>362</u>	<u>363</u>	<u>364</u>	<u>365</u>	<u>366</u>	<u>367</u>	<u>368</u>	<u>369</u>
370	321	322	374	375	379	380	<u>382</u>	387	388	<u>389</u>	390	392	393	394	399
<u>400</u>	404	<u>405</u>	<u>406</u>	<u>407</u>	408	409	410	411	<u>412</u>	<u>413</u>	414	415	<u>416</u>	417	<u>418</u>
419	420	421	<u>422</u>	423	424	<u>425</u>	426	428	429	431	432	433	434	435	<u>436</u>
437	438	439	440	<u>442</u>	443	444	<u>445</u>	<u>446</u>	<u>447</u>	450	<u>451</u>	<u>453</u>	<u>454</u>	<u>455</u>	456
457	458	459	<u>461</u>	<u>462</u>	<u>463</u>	<u>464</u>	<u>465</u>	<u>468</u>	<u>471</u>	472	<u>473</u>	<u>474</u>	476	477	480
481	<u>482</u>	484	485	<u>486</u>	487	<u>489</u>	490	491	492	493	494	496	<u>497</u>	498	499
500	501	<u>502</u>	<u>503</u>	<u>504</u>	505	<u>506</u>	507	508	509	510	511	<u>512</u>	513	<u>514</u>	<u>515</u>
516	512	518	519	<u>520</u>	521	522	<u>523</u>	524	525	526	<u>527</u>	<u>528</u>	<u>529</u>	530	531
<u>532</u>	<u>533</u>	534	<u>535</u>	536	539	541	542	543	544	<u>545</u>	<u>546</u>	548	549	552	<u>553</u>
555	556	557	558	<u>559</u>	560	561	562	<u>563</u>	564	<u>565</u>	<u>567</u>	<u>568</u>	<u>569</u>	571	574
<u>575</u>	576	<u>577</u>	<u>579</u>	580	<u>582</u>	583	<u>588</u>	591	<u>592</u>	<u>593</u>	<u>594</u>	<u>595</u>	<u>596</u>		

REFERENCIAS (cuyos contenidos se incorpora a la presente memoria por referencia)

- [1] Russo y Johnson (2000) J Infect Dis 181:1153-1754.
- 5 [2] Uehling y col. (1997) J Urol 157:2049-2052.
- [3] Tammen (1990) Br J Urol 65:6-9.
- [4] Langermann y col. (1997) Science 276:607-611.
- [5] Documento WO03/074553.
- [6] Documento WO01/66572.
- 10 [7] Janke y col. (2001) FEMS Microbiol Lett 199:61-66.
- [8] Documento WO2004/005535.

- [9] Dobrindt y col. (2002) *Infect Immun* 70:6365-6372.
- [10] Documento US2003/0165870.
- [11] Welch et al (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:17020-17024.
- [12] American Type Culture Collection: ATCC 700928.
- 5 [13] *European Journal of Biochemistry* 2003; 1 Suplemento 1 julio: resumen P1.3-11.
- [14] Geysen y col. (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- [15] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-223.
- [16] Jameson, BA y col. 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
- [17] Radrizzani y Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-189.
- 10 [18] De Lalla y col. (1999) *J. Immunol.* 163:1725-1729.
- [19] Brusica y col. (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-130.
- [20] Meister y col. (1995) *Vaccines* 13(6):581-591.
- [21] Roberts y col. (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
- [22] Maksyutov y Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-297.
- 15 [23] Feller y de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-721.
- [24] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
- [25] Welling y col. (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
- [26] Davenport y col. (1995) *Immunogenetics* 42:392-397.
- [27] Bodanszky (1993) *Principles of Peptide Synthesis* (ISBN: 0387564314).
- 20 [28] Fields y col. (1997) *Meth Enzymol* 289: Solid-Phase Peptide Synthesis. ISBN: 0121821900.
- [29] Chan y White (2000) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. ISBN: 0199637245.
- [30] Kullmann (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*. ISBN: 0849368413.
- [31] Ibba (1996) *Biotechnol Genet Eng Rev* 13:197-216.
- [32] Breedveld (2000) *Lancet* 355(9205):735-740.
- 25 [33] Gorman y Clark (1990) *Semin. Immunol.* 2:457-466.
- [34] Sambrook y col. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [35] Ausubel y col. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5ª edición (Current Protocols).
- [36] Patente de Estados Unidos 5.707.829.
- 30 [37] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel y col. eds., 1987) Suplemento 30.
- [38] Documento EP-B-0509612.
- [39] Documento EP-B-0505012.
- [40] Johnson y Stell (2001) *J Clin Microbiol* 39:3712-3717.
- [41] Tang y col. (1997) *Clin. Chem.* 43:2021-2038.
- 35 [42] Documento PCT/EB2005/003494.
- [43] Bernadac y col. (1998) *J Bacteriol* 180(18):4872-4878.
- [44] Documento EP-1441036.

- [45] Sorensen y Mortensen (2005) *Journal of Biotechnology* 115:113-128.
- [46] Meynial-Salles y col. (2005) *Applied and Environmental Microbiology* 71:2140-2144.
- [47] Documento US2004/0209370.
- [48] documento WO00/68253.
- 5 [49] documento WO97/04110.
- [50] Alper y col. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:12678-12683.
- [51] Documento WO 01/09350.
- [52] Patente europea 0624376.
- [53] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- 10 [54] Documento WO00/23105.
- [55] documento WO90/14837.
- [56] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-2680.
- [57] Frey y col. (2003) *Vaccine* 21:4234-4237.
- [58] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volumen 42 de *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- 15 [59] Patente de Estados Unidos 6.299.884.
- [60] Patente de Estados Unidos 6.451.325.
- [61] Allison y Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-525.
- [62] Hariharan y col. (1995) *Cancer Res* 55:3486-3489.
- 20 [63] Patente de Estados Unidos 5.057.540.
- [64] Documento WO96/33739.
- [65] Documento EP-A-0109942.
- [66] Documento WO96/11711.
- [67] Documento WO00/07621,
- 25 [68] Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [69] Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [70] Niikura y col. (2002) *Virology* 293:273-280.
- [71] Lenz y col. (2001) *J Immuno/* 166:5346-5355.
- [72] Pinto y col. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- 30 [73] Gerber y col. (2001) *Virology* 75:4752-4760.
- [74] Documento WO03/024480.
- [75] Documento WO03/024481.
- [76] Gluck y col. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [77] Documento EP-A-0689454.
- 35 [78] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [79] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [80] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.

- [81] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [82] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [83] Documento WO02/26757.
- [84] Documento WO99/62923.
- 5 [85] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [86] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [87] Documento WO98/40100.
- [88] Patente de Estados Unidos 6.207.646.
- [89] Patente de Estados Unidos 6.239.116.
- 10 [90] Patente de Estados Unidos 6.429.199.
- [91] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658.
- [92] Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [93] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [94] Documento WO01/95935.
- 15 [95] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [96] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [97] Documento WO03/035836.
- [98] Documento WO95/17211.
- [99] Documento WO98/42375.
- 20 [100] Beignon y col. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [101] Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [102] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [103] Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [104] Ryan y col. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- 25 [105] Partidos y col. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [106] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [107] Pine y col. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [108] Domenighini y col. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [109] Documento WO03/011223.
- 30 [110] Documento WO99/40936.
- [111] Documento WO99/44636.
- [112] Lillard JW y col., (2003) *Blood* 101(3):807-814. Epub 2002 Sep 12.
- [113] Singh y col. (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [114] Documento WO99/27960.
- 35 [115] Patente de Estados Unidos 6.090.406.
- [116] Patente de Estados Unidos 5.916.588.
- [117] Documento EP-A-0626169.

- [118] Documento WO99/52549.
- [119] Documento WO01/21207.
- [120] Documento WO01/21152.
- [121] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- 5 [122] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [123] Documento US 4.680.338.
- [124] Documento US 4.988.815.
- [125] Documento WO92/15582.
- [126] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- 10 [127] Wu y col. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
- [128] Vasilakos y col. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
- [129] Patentes de Estados Unidos 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
- 15 [130] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [131] Documento WO04/60308
- [132] Documento WO04/64759.
- [133] Documento US 6.924.271.
- 20 [134] Documento US2005/0070556.
- [135] Documento US 5.658.731.
- [136] Wong y col. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- [137] Documento US2005/0215517.
- [138] Documento WO02/072012.
- 25 [139] Signorelli y Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-1186.
- [140] Documento W02004/064715.
- [141] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-580.
- [142] Documento PCT/US2005/022769.
- [143] Documento W02004/87153.
- 30 [144] Documento US 6.605.617.
- [145] Documento WO02/18383.
- [146] Documento WO2004/018455.
- [147] Documento WO03/082272.
- [148] Patente de Estados Unidos 5.011.828.
- 35 [149] Documento US-6586409.
- [150] Documento WO99/11241.
- [151] Documento WO94/00153.
- [152] Documento WO98/57659.

- [153] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- [154] Documento WO03/009869.
- [155] Glezen y Alpers (1999) Clin. Infect. Dis. 28:219-224.
- [156] Johnson y col. (2001) Infect Immun 69:1306-1314.
- 5 [157] Johnson y col. (2001) J Infect Dis 183:897-906 (véase también 183:1546).
- [158] Johnson, Hopkins (1998) Infection and Immunity 66:6063-6064.
- [159] Bahrani-Mougeot y col.; Molecular Microbiology (2002) 45(4), 1079-1093.
- [160] Johnson y col., Infection and Immunity, (1998) 3059-3065.
- [161] Almeida y Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.
- 10 [162] Agarwal y Mishra (1999) Indian JExp Biol 37:6-16.
- [163] Costantino y col. (1992) Vaccine 10:691-698.
- [164] Costantino y col. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
- [165] Solicitud de patente internacional WO03/007985.
- [166] Documento WO 99/24578.
- 15 [167] Documento WO 99/36544.
- [168] Documento WO 99/57280.
- [169] Documento WO 00/66791.
- [170] Documento WO 01/64922.
- [171] Documento WO 01/64920.
- 20 [172] Documento WO 03/020756.
- [173] Documento WO 2004/032958.
- [174] Documento WO 2004/048404.
- [175] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
- [176] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285.
- 25 [177] Jedrzejcas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
- [178] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
- [179] Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
- [180] Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Supl.:S63-68 y 79-80.
- [181] Hsu y col. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915.
- 30 [182] Stratov y col. (2004) Curr Drug Tgts 5(1):71-88.
- [183] Plotkin y col. (eds) (2003) Vaccines, 4ª edición (W.B. Saunders Company).
- [184] Del Giudice y col. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
- [185] Gustafsson y col. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
- [186] Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9:232-238.
- 35 [187] Sutter y col. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
- [188] Zimmerman y Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.
- [189] McMichael (2000) Vaccine 19 Supl. 1:S101-S107.

- [190] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-56.
- [191] Documento WO03/34771.
- [192] Documento WO 99/54457.
- [193] Documento WO 04/01846.
- 5 [194] Documento WO 04/041157.
- [195] Documento WO 05/028618.
- [196] Documento WO 99/24578.
- [197] Documento WO 99/36544.
- [198] Documento WO 99/57280.
- 10 [199] Documento WO 02/079243.
- [200] Documento WO 02/02606.
- [201] Kalman y col. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [202] Read y col. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-1406.
- [203] Shirai y col. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Supl. 3):S524-S527.
- 15 [204] Documento WO 99/27105.
- [205] Documento WO 00/27994.
- [206] Documento WO 00/37494.
- [207] Documento W02005/084306.
- [208] Documento W02005/002619.
- 20 [209] Ross y col. (2001) *Vaccines* 19:4135-4142.
- [210] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Supl.:S2-S6.
- [211] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Enero 16;47(1):12, 19.
- [212] Anderson (2000) *Vaccine* 19 Supl. 1:559-565.
- [213] Kahn (2000) *Curr Opin Pediatr* 12:257-262.
- 25 [214] Crowe (1995) *Vaccine* 13:415-421.
- [215] Modlin y col. (2001) *J Toxicol Clin Toxicol* 39:85-100.
- [216] Demicheli y col. (1998) *Vaccine* 16:880-884.
- [217] Stepanov y col. (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.
- [218] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- 30 [219] Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [220] Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
- [221] Documento WO 00/09699.
- [222] Documento EP-A-0372501.
- [223] Documento EP-A-0378881.
- 35 [224] Documento EP-A-0427347.
- [225] Documento WO93/17712.
- [226] Documento WO94/03208.

- [227] Documento WO98/58668.
- [228] Documento EP-A-0471177
- [229] Documento EP-A-0594610.
- [230] Documento WO00/56360.
- 5 [231] Documento WO91/01146.
- [232] Documento WO00/61761.
- [233] Documento WO01/72337.
- [234] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- [235] Baraldo y col. (2004) Infect Immun.72:4884-4887.
- 10 [236] Documento WO02/091998.
- [237] Kuo y col. (1995) Infect Immun 63:2706-2713.
- [238] Research Disclosure, 453077 (Eneero 2002).
- [239] Donnelly y col. (1997) Annu Rev Immunol 15:617-648.
- [240] Strugnell y col. (1997) Immunol Cell Biol 75(4):364-369.
- 15 [241] Cui (2005) adv Genet 54:257-89.
- [242] Robinson y Torres (1997) Seminars in Immunol 9:271-283.
- [243] Brunham y col. (2000) J Infect Dis 181 Supl. 3:S538-S543.
- [244] Svanholm y col. (2000) Scand J Immunol 51(4):345-353.
- [245] DNA Vaccination - Genetic Vaccination (1998) eds. Koprowski y col. (ISBN 3540633928).
- 20 [246] Gene Vaccination: Theory and Practice (1998) ed. Raz (ISBN 3540644288).
- [247] Findeis y col., Trends Biotechnol. (1993) 11:202.
- [248] Chiou y col. (1994) Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer. ed. Wolff.
- [249] Wu y col., J. Biol. Chem. (1988) 263:621.
- [250] Wu y col., J. Biol. Chem. (1994) 269:542.
- 25 [251] Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87:3655,
- [252] Wu y col., J. Biol. Chem. (1991) 266:338.
- [253] Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51.
- [254] Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845.
- [255] Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185.
- 30 [256] Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148.
- [257] Documento WO 90/07936.
- [258] Documento WO 94/03622.
- [259] Documento WO 93/25698.
- [260] Documento WO 93/25234.
- 35 [261] Documento US 5.219.740.
- [262] Documento WO 93/11230.
- [263] Documento WO 93/10218.

- [264] Documento US 4.777.127.
- [265] Documento GB 2.200.651.
- [266] Documento EP-A-0 345 242.
- [267] Documento WO 91/02805.
- 5 [268] Documento WO 94/12649.
- [269] Documento WO 93/03769.
- [270] Documento WO 93/19191.
- [271] Documento WO 94/28938.
- [272] Documento WO 95/11984.
- 10 [273] Documento WO 95/00655.
- [274] Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.
- [275] Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985.
- [276] Documento US 5.814.482.
- [277] Documento WO 95/07994.
- 15 [278] Documento WO 96/17072.
- [279] Documento WO 95/30763.
- [280] Documento WO 97/42338.
- [281] Documento WO 90/11092.
- [282] Documento US 5.580.859.
- 20 [283] Documento US 5.422.120.
- [284] Documento WO 95/13796.
- [285] Documento WO 94/23697.
- [286] Documento WO 91/14445.
- [287] Documento EP 0524968.
- 25 [288] Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411.
- [289] Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:11581.
- [290] Documento US 5.206.152.
- [291] Documento WO 92/11033.
- [292] Documento US 5.149.655.
- 30 [293] Documento WO 92/11033.
- [294] Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453.
- [295] Rice y col. (2000) Trends Genet 16:276-277.
- [296] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [297] Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.).
- 35 [298] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications).
- [299] Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor

Laboratory Press).

[300] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997).

[301] Ausubel y col. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).

5 [302] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press).

[303] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton y Graham eds., 1997, Springer Verlag).

[304] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=PubMed>

[305] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=26111674>

[306] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=26111641&itemID=33&view=gbwithparts>

10 [307] Blattner y col. (1997) Science 277:1453-1474.

[308] Murphy (1998) J. Bacteriol 180:2063-2071.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende: (a) la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 577; (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 577; (c) una secuencia de aminoácidos que es un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N° 577; o (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 577 e incluye un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N° 577, para su uso en medicina.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho fragmento comprende al menos un epítoto de células B de la secuencia SEC ID N° 577.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de las reivindicaciones 1 ó 2, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Una composición farmacéutica que comprende dos o más polipéptidos de las reivindicaciones 1 ó 2, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición de la reivindicación 3 o reivindicación 4, que comprende adicionalmente un adyuvante de vacuna.
- 15 6. Uso del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la fabricación de un medicamento para producir una respuesta inmune en un paciente.
7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso para producir una respuesta inmune en un paciente.
8. El uso de la reivindicación 6, o el polipéptido de la reivindicación 7, en el que la respuesta inmune es protectora contra infección por ExPEC.

20

FIGURA 1

