

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 890**

51 Int. Cl.:

A61K 39/108 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2021** **PCT/EP2021/050707**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2021** **WO21144369**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2021** **E 21700027 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024** **EP 4090363**

54 Título: **Mutante de FimH, composiciones con el mismo y uso del mismo**

30 Prioridad:

16.01.2020 EP 20152217

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2024

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1125 Trenton-Harbourton Road
Titusville, NJ 08560, US

72 Inventor/es:

GRIJPSTRA, JAN;
WEERDENBURG, EVELINE, MARLEEN;
GEURTSSEN, JEROEN;
FAE, KELLEN, CRISTHINA y
FEITSMA, LOURIS, JAKOB

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 987 890 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

Mutante de FimH, composiciones con el mismo y uso del mismo

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a los campos de la microbiología médica, la inmunología y las vacunas. En particular, la invención se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio de lectina de FimH que comprende una mutación de aminoácidos que hace que el dominio de lectina de FimH esté en una conformación con baja afinidad por manosa e induce altos niveles de inhibición mediada por anticuerpos de la adhesión de *E. coli* a células epiteliales de la vejiga tras la administración a un sujeto. Además, la invención se refiere a composiciones que comprenden dichos polipéptidos y a métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite mediante la administración del polipéptido inmunógeno.

15 **Antecedentes de la invención**

Las cepas de *E. coli* responsables de infecciones extraintestinales son genéticamente distintas de las que causan enfermedades intestinales y se han denominado *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). Las ExPEC son los organismos entéricos gramnegativos más comunes que causan infecciones extraintestinales en los entornos ambulatorios, de cuidados a largo plazo y hospitalarios. Las infecciones extraintestinales típicas debidas a *E. coli* incluyen infecciones de las vías urinarias (IVU), diversas infecciones intraabdominales (IIA), neumonía, infección del sitio quirúrgico, meningitis, infección del dispositivo intravascular, osteomielitis e infecciones de tejidos blandos, cualquiera de las cuales puede estar acompañada de bacteriemia. La *E. coli* es una de las principales causas de septicemia grave y es responsable de altas tasas de morbilidad y mortalidad.

La ExPEC, al igual que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, produce fimbrias de tipo I, que ayudan a la adhesión a las superficies epiteliales de las mucosas. Estas fimbrias de tipo I son estructuras pseudopilosas que emanan de los miembros de la superficie de la familia *Enterobacteriaceae*. El componente principal de las fimbrias de tipo I son subunidades repetidas de FimA dispuestas en una hélice dextrógira para formar un filamento de aproximadamente 1 µm de longitud y 7 nm de diámetro con un orificio axial central (Brinton, 1965). Junto con FimA como subunidad principal, el filamento fimbrial también contiene FimF, FimG y FimH como subunidades proteicas secundarias. La subunidad proteica secundaria FimH es una adhesina que se une a manano y promueve la adherencia de las bacterias fimbriadas de tipo I a las glucoproteínas que contienen manosa en las superficies de las células eucariotas y representa una familia de proteínas que se unen a diversas dianas, incluyendo manano y fibronectina. Los estudios de microscopía electrónica inmunológica han revelado que FimH está ubicada estratégicamente en las puntas distales de las fimbrias de tipo I, donde parece formar un complejo con FimG, formando una estructura de fibrilla flexible, y también está ubicada longitudinalmente a diversos intervalos a lo largo del filamento.

Se ha demostrado que la proteína adhesina FimH induce protección cuando se utiliza como vacuna en diversos modelos preclínicos contra las IVU (Langermann S, *et al.*, 1997, Science, 276: 607-611; Langermann S, *et al.*, 2000, J Infect Dis, 181: 774-778; O'Brien VP *et al.*, 2016, Nat Microbiol, 2:16196). En 1999, Medimmune llevó a cabo una vacuna de subunidad que contenía FimH a ensayos de fase II, pero el desarrollo de la vacuna se interrumpió en 2003 por falta de eficacia en la prevención de las IVU (véase, por ejemplo, Brumbaugh AR y Mobley HLT, 2012, Expert Rev Vaccines, 11: 663-676). No obstante, la empresa Sequoia Sciences parece estar desarrollando clínicamente en la actualidad una vacuna para las IVU recurrentes, consistiendo la vacuna en la proteína FimH en complejo con la proteína FimC y combinada con una nueva formulación adyuvante. La empresa informa que esta vacuna fue altamente inmunógena y bien tolerada y puede reducir la frecuencia de las IVU, aunque aún deben establecerse la seguridad y la eficacia (<https://www.sequoiasciences.com/uti-vaccine-program>).

Se ha demostrado que durante la infección por *E. coli*, el dominio de lectina de la adhesina FimH, que se une a los receptores manosilados, puede adoptar dos conformaciones distintas: Baja afinidad por la manosa (tensa) y alta afinidad por la manosa (alargada/relajada) (Kalas *et al.*, 2017, Sci Adv 10:3(2)). La conformación de baja afinidad promueve la motilidad bacteriana y la colonización de nuevos tejidos. La conformación de alta afinidad asegura una adhesión bacteriana firme bajo las fuerzas mecánicas de la excreción de orina (Kalas *et al.*, 2017, anteriormente). Además, se ha demostrado que los anticuerpos contra la variante de baja afinidad bloquean la unión bacteriana a las células uroepiteliales y reducen los recuentos de UFC en la vejiga (Tchesnokova, 2011 Infect Immun. 79(10):3895-904; Kisiela, 2013 Proc Natl Acad Sci, 19; 110(47): 19089-94).

El documento WO02102974 describe una serie de mutantes de FimH que comprenden una modificación de aminoácidos en la región del cañón de la molécula. Específicamente, el documento WO02102974 describe variantes en donde se mutan los residuos que interactúan con la manosa en el sitio de unión. Se selecciona esta ubicación de la mutación porque mantendría al mutante de FimH en una conformación más abierta y, por lo tanto, expondría epítomos que son poco accesibles en la proteína de tipo natural. Sin embargo, hasta la fecha, hasta donde se sabe, ninguno de estos mutantes ha sido investigado como candidato a vacuna. En ensayos clínicos, solo se ha usado FimH de tipo natural.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de vacunas que puedan inducir anticuerpos altamente inhibidores contra infecciones bacterianas causadas por *E. coli*.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH que comprende, en donde el dominio de lectina de FimH comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina (V), isoleucina (I), leucina (L), glicina (G), metionina (M) y alanina (A) en la posición que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un complejo que comprende un polipéptido FimH de longitud completa de acuerdo con la invención y FimC (FimCH).

En un tercer aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención, un complejo de acuerdo con la invención o un polinucleótido de acuerdo con la invención.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un polipéptido de acuerdo con la invención, un complejo de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un polipéptido de acuerdo con la invención, un complejo de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra una bacteria de la familia de *Enterobacteriaceae*. La invención se refiere además a un método para tratar o prevenir una afección relacionada con enterobacilos en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de un polipéptido de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la invención.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona además un método para producir un polipéptido que comprende expresar el polipéptido a partir de una célula recombinante que contiene el polinucleótido de la invención y/o el vector de la invención, opcionalmente, el método comprende además recuperar el polipéptido que va seguido opcionalmente por la formulación en una composición farmacéutica del polipéptido.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Niveles de anticuerpos séricos FimH (IgG total) inducidos por diferentes variantes de FimH. Ratas Wistar (n = 2) recibieron 4 inmunizaciones intramusculares los días 0, 7, 10 y 18 con 60 ug/dosis de las diferentes variantes de FimH combinadas con un adyuvante no Freund (modelo de rata Speedy, Eurogentec). Los niveles de anticuerpos anti FimH se midieron mediante ELISA antes de la inmunización (día 0, círculos de color blanco) y después de la inmunización (día 28, círculos de color negro). Los datos representan la media de muestras de suero duplicadas de 2 animales/grupo. Los valores de anticuerpos (CE50) se calcularon basándose en un modelo de regresión logística de 4 parámetros ajustado a una curva de dilución de 12 etapas.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un polipéptido novedoso que comprende un dominio de lectina de FimH en donde el dominio de lectina de FimH está "bloqueado" en una conformación con baja afinidad por manosa, también denominada en el presente documento la "conformación de baja afinidad". La presente invención se basa en parte en la observación de que el antígeno FimH en la conformación de baja afinidad por manosa es capaz de inducir anticuerpos que pueden inhibir la adhesión mediada por manósidos. Estos anticuerpos son altamente inhibidores y tienen un efecto mejorado en la prevención o el tratamiento de infecciones bacterianas. Se encontró en el presente documento que un dominio de lectina de FimH con una mutación F144V tiene una combinación sorprendentemente buena de propiedades deseables que lo hacen muy adecuado para su uso en vacunas contra IVU, por ejemplo, para prevenir o reducir las IVU recurrentes.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido, preferentemente un polipéptido inmunógeno, que comprende un dominio de lectina de FimH, en donde el dominio de lectina de FimH comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina (V), isoleucina (I), leucina (L), glicina (G), metionina (M) y alanina (A), en la posición que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1.

La posición de aminoácidos 144 se refiere a la posición 144 en la secuencia de aminoácidos de referencia del dominio

de lectina de FimH de SEQ ID NO: 1. En secuencias de aminoácidos de la invención distintas de la SEQ ID NO: 1, preferentemente, la posición de aminoácidos 144 está presente en una posición de aminoácidos correspondiente a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1, preferentemente en una alineación de secuencia ClustalW (1.83) usando configuraciones predeterminadas. El experto en la técnica sabrá cómo identificar posiciones de aminoácidos correspondientes en secuencias de aminoácidos del dominio de lectina de FimH distintas de la SEQ ID NO: 1 usando algoritmos de alineación de secuencias de aminoácidos como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En una realización, el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención comprende una mutación que hace que el dominio de lectina de FimH esté en la conformación de baja afinidad por manosa. En una realización, el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención se ha mutado en una posición que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1. La mutación puede ser cualquiera de una delección, adición o sustitución de un único residuo de aminoácido. Preferentemente, la mutación es una sustitución de un único residuo de aminoácido. La mutación es preferentemente una sustitución de un residuo de aminoácido que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, la mutación es una sustitución de un residuo de aminoácido fenilalanina (F) en una posición que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1. En el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de la invención, la posición que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1 se sustituye preferentemente por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina (V), isoleucina (I), leucina (L), glicina (G), metionina (M) y alanina (A). Los términos "mutación", "mutado" o "sustitución", "sustituido" en este contexto significan que, en la posición indicada, está presente otro aminoácido que no está presente en la molécula original correspondiente, que en este caso es un polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH con F en la posición 144. Dicha molécula original puede existir físicamente como polipéptido o en forma de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, pero también puede existir simplemente *in silico* o en papel como una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, en este contexto también se considera que existe una mutación o sustitución, por ejemplo, si una proteína se expresa a partir de un ácido nucleico que se ha sintetizado de manera que codifica la mutación o sustitución, aunque el ácido nucleico que codifica la molécula original correspondiente no se haya preparado inicialmente durante el proceso, por ejemplo, cuando la molécula de ácido nucleico se ha preparado completamente mediante síntesis química.

En una realización preferida, el polipéptido que comprende el dominio de lectina de FimH de la invención comprende la sustitución de fenilalanina (F) por valina (V) en la posición 144. En determinadas realizaciones, el polipéptido que comprende el dominio de lectina de FimH de la invención es un polipéptido de origen no natural que comprende una valina en la posición 144. En determinadas realizaciones, el polipéptido que comprende el dominio de lectina de FimH de la invención tiene una valina en la posición 144 en lugar de la fenilalanina de origen natural.

En una realización, el dominio de lectina de FimH tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, el dominio de lectina de FimH puede comprender una secuencia que tiene la SEQ ID NO: 1, con la excepción de la posición 144 que para el dominio de lectina de FimH de la invención está sustituida por valina (V), isoleucina (I), leucina (L), glicina (G), metionina (M) o alanina (A).

FimH de longitud completa (FimH_{FL}) está compuesta por dos dominios: el dominio de lectina en el extremo N (FimH_{LD}) conectado al dominio de pilina en el extremo C (FimH_{PD}) mediante un enlazador de bucle de tetrapéptidos corto. En una realización de la invención, el polipéptido que comprende el dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención comprende además un dominio de pilina de FimH. En una realización preferida, el polipéptido de la invención es un polipéptido FimH de longitud completa en donde el dominio de lectina de FimH comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina (V), isoleucina (I), leucina (L), glicina (G), metionina (M) y alanina (A) en la posición que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1.

En una realización, el polipéptido es una FimH de longitud completa que tiene al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Preferentemente, el polipéptido FimH de longitud completa puede comprender una secuencia que tiene la SEQ ID NO: 2, con la excepción de la sustitución F144V como se describe en el presente documento. En otra realización, el polipéptido es una FimH de longitud completa que tiene al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4, o preferentemente al menos con los aminoácidos 22-300 de la misma. Preferentemente, el polipéptido FimH de longitud completa puede comprender una secuencia que tiene la SEQ ID NO: 4 o más preferentemente al menos los aminoácidos 22-300 de la misma, con la excepción de la sustitución F144V como se describe en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el polipéptido es una FimH de longitud completa que tiene al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 23-45 y 55 como se describe en el documento US6.737.063.

Los polipéptidos FimH no solo están muy conservados entre diversas cepas de *E. coli*, sino que también están muy conservados entre una amplia gama de bacterias gramnegativas. Además, los cambios de aminoácidos que tienen

lugar entre cepas generalmente se producen en posiciones de aminoácidos similares. Como resultado de la alta conservación de FimH entre cepas de *E. coli*, los polipéptidos FimH de una cepa son capaces de inducir respuestas de anticuerpos que inhiben o impiden que otras cepas de *E. coli* se unan a las células mediante una lectina de FimH y/o brindan protección y/o tratamiento contra la infección causada por otras cepas de *E. coli*. Por consiguiente, en una realización, la FimH de longitud completa tiene al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5, o preferentemente al menos con los aminoácidos 22-300 de la misma. Preferentemente, el polipéptido FimH de longitud completa puede comprender una secuencia que tiene la SEQ ID NO: 5 o más preferentemente al menos los aminoácidos 22-300 de la misma, con la excepción de la sustitución F144 V como se describe en el presente documento. En otra realización, la FimH de longitud completa tiene al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6. Preferentemente, el polipéptido FimH de longitud completa puede comprender una secuencia que tiene la SEQ ID NO: 6, con la excepción de la sustitución F144V como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "chaperona periplásmica" se define como una proteína localizada en el periplasma de las bacterias que es capaz de formar complejos con una diversidad de proteínas de unión a chaperona mediante el reconocimiento de un epítipo de unión común (o epítopos). Las chaperonas sirven como plantillas sobre las que las proteínas exportadas desde la célula bacteriana al periplasma se pliegan en sus conformaciones nativas. La asociación de la proteína de unión a chaperona con la chaperona también sirve para proteger las proteínas de unión de la degradación por proteasas localizadas dentro del periplasma, aumenta su solubilidad en una solución acuosa y conduce a su incorporación correcta secuencialmente en un pilus de ensamblaje. Las proteínas chaperonas son una clase de proteínas en bacterias gramnegativas que participan en el ensamblaje de los pili al mediar en dicho ensamblaje, pero no se incorporan a la estructura. FimC es la proteína chaperona periplásmica de FimH. FimC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. En determinadas realizaciones, FimC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 29 como se describe en el documento US6.737.063.

El complejo no covalente de FimC y FimH se denomina FimCH.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención proporciona un complejo que comprende un polipéptido que comprende el dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención y que comprende además un dominio de pilina de FimH o un FimH de longitud completa como se describe en el presente documento y FimC.

En una realización de la invención, el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención comprende además un dominio de pilina de FimH y se combina con FimC para formar un complejo FimCH.

Los inventores de la presente solicitud han creado varias variantes del dominio de lectina de FimH con diferentes cambios de aminoácidos y han ensayado su eficacia en diversos ensayos (véanse los ejemplos). Sorprendentemente, no todas las proteínas FimH ensayadas con mutaciones del dominio de lectina fueron capaces de incorporarse en un complejo FimCH con las propiedades deseadas, es decir, que tuvieran suficiente pureza (concentración de proteína y grado de pureza), integridad y funcionalidad.

El dominio de lectina de FimH descrito en el presente documento que comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina (V), isoleucina (I), leucina (L), glicina (G), metionina (M) y alanina (A), en la posición que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1 fue capaz de formar un complejo FimCH que tenía las propiedades deseadas.

En una realización, el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención es una FimH de longitud completa que tiene al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y forma un complejo con FimC para formar un complejo FimCH. Una FimH de longitud completa en su forma final típicamente no incluye el péptido señal, que se muestra, por ejemplo, como los aminoácidos 1-21 de las SEQ ID NO: 4 y 5, es decir, se entiende que una FimH de longitud completa de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 incluye los aminoácidos 22-300 de estas secuencias mientras que típicamente carece de los aminoácidos 1-21 de las mismas. Para la producción recombinante de una FimH de longitud completa, es útil codificar la FimH que incluye el péptido señal en la célula hospedadora recombinante, para lograr el transporte a través de la membrana interna (citoplasmática) a través de la vía secretora general que conduce a la ubicación periplásmica del polipéptido (a veces denominada "expresión periplásmica"), pero en el polipéptido FimH final, como se aísla y, por ejemplo, se usa en composiciones farmacéuticas, el péptido señal típicamente ya no está presente como resultado del procesamiento por parte de la célula recombinante que está expresando el polipéptido.

En una realización más preferida, el complejo FimCH comprende o consiste en una proteína FimC que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o al menos aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y una proteína FimH que comprende un dominio de lectina que tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina (V), isoleucina (I), leucina (L), glicina (G), metionina (M) y alanina (A), en la posición que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1. En una realización incluso más preferida, el

complejo FimCH comprende o consiste en una proteína FimC que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o al menos aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y una proteína FimH que comprende una sustitución F144V en el dominio de lectina o una proteína FimH de longitud completa que comprende una sustitución F165V (por ejemplo, en las SEQ ID NO: 4 o 5 que aún incluyen el péptido señal). En una FimH de longitud completa que aún incluiría el péptido señal, la posición de aminoácidos 165 corresponde a la posición de aminoácidos 144 en el dominio de lectina de FimH. El experto sabrá cómo identificar las posiciones de aminoácidos correspondientes en secuencias de aminoácidos FimH de longitud completa y en secuencias de aminoácidos del dominio de lectina de FimH usando algoritmos de alineación de secuencias de aminoácidos como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En una realización, los complejos que comprenden la chaperona de *E. coli* FimC y una variante del dominio de lectina de FimH de la invención pueden formarse mediante la coexpresión del polipéptido de la variante del dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención junto con FimC, a partir de una célula recombinante.

En una realización, el complejo FimCH comprende un FimC que se origina a partir de una cepa bacteriana mientras que FimH se origina a partir de una cepa bacteriana diferente. En otra realización, el complejo FimCH comprende una FimC y una FimH, ambas originarias de la misma cepa bacteriana. En determinadas realizaciones, FimH o FimC o tanto FimH como FimC pueden ser secuencias artificiales que no provienen de aislamientos bacterianos reales que existen en la naturaleza, por ejemplo, también se pueden basar en secuencias de consenso o combinaciones de aislados naturales.

En una realización, el complejo FimCH comprende al menos un polipéptido que comprende una etiqueta His. En una realización, la FimH de longitud completa de acuerdo con la invención comprende una etiqueta His o la FimC, como se describe en el presente documento, comprende una etiqueta His. Preferentemente, en el complejo FimCH, la FimC comprende la etiqueta His. Como se usa en el presente documento, la etiqueta His es un tramo de residuos de histidina (His), por ejemplo, seis residuos His, que pueden añadirse internamente o preferentemente en el extremo N o C de una proteína. Tal etiqueta tiene un uso bien conocido para facilitar la purificación.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido FimH como se ha definido anteriormente en el presente documento. El polinucleótido puede estar precedido por un promotor unido operativamente al mismo. En determinadas realizaciones, el promotor es endógeno a la secuencia codificante de FimH. En determinadas realizaciones, el promotor es un promotor endógeno que impulsa la expresión de FimH en una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*. En otras realizaciones, el promotor es heterólogo a la secuencia codificante de FimH, por ejemplo, se usa un promotor fuerte conocido por el experto en la técnica para su uso en sistemas de expresión recombinante. Por ejemplo, se puede usar un vector pET-DUET que comprende un promotor Lac inducible para la expresión de FimH y/o FimC. En el caso de un promotor inducible, se puede usar IPTG para inducir la expresión. Preferentemente, el polinucleótido se aísla de su entorno natural. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un polinucleótido aislado de acuerdo con la invención. El polipéptido puede ser un polinucleótido recombinante, sintético o artificial. El polinucleótido puede estar en cualquier forma de ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, preferentemente ADN. El polinucleótido puede comprender uno o más nucleótidos que no están presentes en un polinucleótido codificante de FimH de origen natural. Preferentemente, el polinucleótido tiene uno o más nucleótidos que no están presentes en un polinucleótido que codifica FimH de origen natural en su extremo 5' y/o extremo 3'. Las secuencias de la FimC y/o FimH madura codificada pueden estar precedidas preferentemente por un péptido señal en los polipéptidos tal como están codificados por los respectivos polinucleótidos, y los péptidos señal pueden ser péptidos señal endógenos de los polipéptidos FimC y/o FimH (es decir, péptidos señal tal como se dan en la naturaleza para estas proteínas), respectivamente, o pueden ser péptidos señal heterólogos, es decir, péptidos señal de otras proteínas o péptidos señal sintéticos. Los péptidos señal son útiles para la expresión periplásmica, pero típicamente se escinden y no están presentes en la FimC y/o FimH finalmente producida y purificada, respectivamente.

Si se requiere y/o se desea, el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención o el polinucleótido que codifica el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención se puede incorporar en una mezcla farmacéuticamente activa añadiendo un portador farmacéuticamente aceptable.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención también proporciona una composición, preferentemente una composición farmacéutica que comprende un dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención o el polinucleótido que codifica el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención.

Las composiciones (farmacéuticas) de la invención pueden comprender cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable, incluyendo un portador, carga, conservante, solubilizante y/o diluyente. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's pharmaceutical sciences", XIII ed. Editor jefe Eric W. Martin. Mack Publishing Co., Easton,

Pa., 2013.

En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden adicionalmente uno o más tampones, por ejemplo, solución salina tamponada con Tris, tampón de fosfato y tampón de sacarosa-fosfato-glutamato.

En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden adicionalmente una o más sales, por ejemplo, tris-clorhidrato, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, fosfato de sodio, glutamato monosódico y sales de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio o una mezcla de dichas sales de aluminio).

Las composiciones de la invención se pueden usar para provocar una respuesta inmunitaria en un hospedador al que se administra la composición, es decir, son inmunógenas. Por lo tanto, las composiciones de la invención se pueden usar como vacunas contra una infección causada por una bacteria de la familia de *Enterobacteriaceae*, preferentemente contra una infección causada por *Klebsiella*, más preferentemente *E. coli* y, por lo tanto, pueden comprender cualquier componente adicional adecuado para su uso en una vacuna. Por ejemplo, un componente adicional de una composición de vacuna es un adyuvante como se describe en el presente documento.

En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden adicionalmente un conservante, tal como fenol, cloruro de bencetonio, 2-fenoxietanol o timerosal. En una realización específica, las composiciones (farmacéuticas) de la invención comprenden entre el 0,001 % y el 0,01 % de conservante. En otras realizaciones, las composiciones (farmacéuticas) de la invención no comprenden un conservante.

En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención se formulan para que sean adecuadas para la vía de administración prevista a un sujeto. Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden formular para que sean adecuadas para administración subcutánea, parenteral, oral, intradérmica, transdérmica, colorrectal, intraperitoneal, intravaginal o rectal. En una realización específica, la composición farmacéutica se puede formular para administración intravenosa, oral, bucal, intraperitoneal, intranasal, intratraqueal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, transdérmica o pulmonar, preferentemente administración intramuscular.

Las composiciones de la invención se pueden incluir en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración.

En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden almacenar antes de su uso, por ejemplo, las composiciones se pueden almacenar congeladas (por ejemplo, a aproximadamente -20 °C o a aproximadamente -70 °C); se pueden almacenar en condiciones refrigeradas (por ejemplo, a aproximadamente 2-8 °C, por ejemplo, aproximadamente 4 °C); o almacenar a temperatura ambiente. Como alternativa, las composiciones separadas que comprenden uno o más de los componentes (i), (ii) y (iii) pueden almacenarse y mezclarse con la composición de combinación de vacunas que comprende los tres de (i), (ii) y (iii) antes de su uso. En otra alternativa más, las composiciones separadas se proporcionan en un programa de administración de combinación.

En una realización de la invención, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar junto con una composición que comprende uno o más polisacáridos unidos covalentemente a una proteína portadora. Preferentemente, dicha composición comprende uno o más bioconjugados del antígeno O de *E. coli* unido covalentemente a una proteína portadora, como se describe, por ejemplo, en el documento WO2019/175145

En una realización, la composición farmacéutica de la invención en el presente documento comprende además un adyuvante. Como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se administra junto con o como parte de una composición de la invención, aumenta, mejora y/o refuerza la respuesta inmunitaria a FimH, pero cuando el compuesto adyuvante se administra solo, no genera una respuesta inmunitaria al conjugado y/o a FimH. Los adyuvantes pueden mejorar una respuesta inmunitaria mediante varios mecanismos incluyendo, por ejemplo, reclutamiento de linfocitos, estimulación de linfocitos B y/o T y estimulación de células presentadoras de antígeno.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden, o se administran junto con, un adyuvante. El adyuvante para administración junto con una composición de la invención se puede administrar antes, concomitantemente con, o después de la administración de las composiciones inmunógenas. En realizaciones preferidas, la FimH de la invención y el adyuvante se administran en forma de una única composición.

Los ejemplos específicos de adyuvantes incluyen, pero sin limitación, sales de aluminio (alumbre) (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y óxido de aluminio, incluyendo nanopartículas que comprenden formulaciones de alumbre o nanoalumbre), fosfato de calcio (por ejemplo, Masson JD *et al.*, 2017, Expert Rev Vaccines 16: 289-299), monofosforil lípido A (MPL) o monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) (véanse, por ejemplo, la patente del Reino Unido GB2220211, EP0971739, EP1194166, US6491919), AS01, AS02, AS03 y AS04 (todos GlaxoSmithKline; véanse, por ejemplo, los documentos EP1126876, US7357936 para AS04, EP0671948, EP0761231, US5750110 para AS02), compuestos de imidazopiridina (véase el documento WO2007/109812), compuestos de imidazoquinoxalina (véase el documento WO2007/109813), delta-inulina (por ejemplo, Petrovsky N y

- PD Cooper, 2015, Vaccine 33: 5920-5926), dinucleótidos cíclicos sintéticos activadores de STING (por ejemplo, el documento US20150056224), combinaciones de homopolímeros de lecitina y carbómero (por ejemplo, el documento US6676958) y saponinas, tales como Quil A y QS21 (véanse, por ejemplo, Zhu D y W Tuo, 2016, Nat Prod Chem Res 3: e113 (doi: 10.4172/2329-6836. 1000e113), opcionalmente junto con QS7 (véase Kensil *et al.*, en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (ed. Powell y Newman, Plenum Press, NY, 1995); documento US 5.057.540). En algunas realizaciones, el adyuvante es adyuvante de Freund (completo o incompleto). En determinadas realizaciones, el adyuvante comprende Quil-A, tal como, por ejemplo, el que se obtiene comercialmente de Brenntag (ahora Croda) o Invivogen. QuilA contiene la fracción extraíble con agua de saponinas del árbol *Quillaja saponaria* Molina. Estas saponinas pertenecen al grupo de saponinas triterpenoides, que tienen una estructura de cadena principal triterpenoide común. Se sabe que las saponinas inducen una fuerte respuesta adyuvante a antígenos dependientes e independientes de T, así como fuertes respuestas de linfocitos CD8+ citotóxicos y potencian la respuesta a antígenos mucosos. También se pueden combinar con colesterol y fosfolípidos, para formar complejos inmunoestimulantes (ISCOM), en donde el adyuvante QuilA puede activar respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos y mediadas por células a una amplia gama de antígenos de diferentes orígenes. En determinadas realizaciones, el adyuvante es AS01, preferentemente AS01B. S01 es un sistema adyuvante que contiene MPL (3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A), QS21 (*Quillaja saponaria* Molina, fracción 21) y liposomas. En determinadas realizaciones, AS01 está disponible comercialmente (GSK) o se puede preparar como se describe en el documento WO 96/33739, Determinados adyuvantes comprenden emulsiones, que son mezclas de dos fluidos inmiscibles, por ejemplo, aceite y agua, uno de los cuales está suspendido como pequeñas gotas dentro del otro, y se estabilizan mediante agentes tensioactivos. Las emulsiones de aceite en agua tienen agua formando la fase continua, rodeando pequeñas gotas de aceite, mientras que las emulsiones de agua en aceite tienen aceite formando la fase continua. Determinadas emulsiones comprenden escualeno (un aceite metabolizable). Determinados adyuvantes comprenden copolímeros en bloque, que son copolímeros formados cuando dos monómeros se agrupan y forman bloques de unidades repetidas. Un ejemplo de una emulsión de agua en aceite que comprende un copolímero en bloque, escualeno y un estabilizador de micropartículas es TiterMax®, que se puede obtener comercialmente en Sigma-Aldrich. Opcionalmente, las emulsiones se pueden combinar con o comprender otros componentes inmunoestimulantes, tales como un agonista de TLR4. Determinados adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tal como escualeno o aceite de cacahuete) también usadas en MF59 (véanse, por ejemplo, los documentos EP0399843, US 6299884, US6451325) y AS03, opcionalmente junto con estimulantes inmunitarios, tal como monofosforil lípido A, y/o QS21, tal como en AS02 (véase Stoute *et al.*, 1997, N. Engl. J. Med. 336, 86-91). Otros ejemplos de adyuvantes son liposomas que contienen estimulantes inmunitarios tales como MPL y QS21, tal como en AS01E y AS01B (por ejemplo, el documento US 2011/0206758). Otros ejemplos de adyuvantes son CpG (Bioworld Today, 15 de noviembre de 1998) e imidazoquinolinas (tales como imiquimod y R848). Véase, por ejemplo, Reed G, *et al.*, 2013, Nature Med, 19: 1597-1608.
- En determinadas realizaciones preferidas, el adyuvante comprende saponinas, preferentemente la fracción extraíble con agua de saponinas obtenidas de *Quillaja saponaria*. En determinadas realizaciones, el adyuvante comprende QS-21.
- En determinadas realizaciones preferidas, el adyuvante contiene un agonista del receptor tipo Toll 4 (TLR4). Los agonistas de TLR4 se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Ireton GC y SG Reed, 2013, Expert Rev Vaccines 12: 793-807. En determinadas realizaciones preferidas, el adyuvante es un agonista de TLR4 que comprende lípido A, o un análogo o derivado del mismo.
- El adyuvante, que incluye preferentemente un agonista de TLR4, puede formularse de diversas maneras, por ejemplo, en emulsiones tales como emulsiones de agua en aceite (Ag./Ac.) o emulsiones de aceite en agua (Ac./Ag.) (ejemplos son MF59, AS03), (nano-)emulsiones estables (SE), suspensiones lipídicas, liposomas, nanopartículas (poliméricas), virosomas, alumbre adsorbida, formulaciones acuosas (AF) y similares, que representan diversos sistemas de suministro de moléculas inmunomoduladoras en el adyuvante y/o para los inmunógenos (véase, por ejemplo, Reed *et al.*, 2013, anteriormente; Alving CR *et al.*, 2012, Curr Opin Immunol 24: 310-315).
- El agonista inmunoestimulante de TLR4 puede combinarse opcionalmente con otros componentes inmunomoduladores, tales como saponinas (por ejemplo, QuilA, QS7, QS21, Matrix M, Iscom, Iscomatrix, etc.), sales de aluminio, activadores de otros TLR (por ejemplo, imidazoquinolinas, flagelina, CpG, análogos de ARNbc, etc.), y similares (véase, por ejemplo, Reed *et al.*, 2013, anteriormente).
- Como se usa en el presente documento, el término "lípido A" se refiere a la fracción lipídica hidrófoba de una molécula de LPS que comprende glucosamina y está unida al ceto-desoxioctulosonato en el núcleo interno de la molécula de LPS a través de un enlace cetosídico, que ancla la molécula de LPS en la hoja externa de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Para obtener una descripción general de la síntesis de estructuras de LPS y lípido A, véase, por ejemplo, Raetz, 1993, J. Bacteriology 175:5745-5753, Raetz CR y C Whitfield, 2002, Annu Rev Biochem 71: 635-700; documentos US 5.593.969 y US 5.191.072. El lípido A, como se usa en el presente documento, incluye el lípido A de origen natural, mezclas, análogos, derivados y precursores del mismo. El término incluye monosacáridos, por ejemplo, el precursor del lípido A denominado lípido X; disacárido lípido A; heptaacilo lípido A; hexaacilo lípido A; pentaacilo lípido A; tetraacilo lípido A, por ejemplo, precursor tetraacilo del lípido A, denominado lípido IVA; lípido A desfosforilado; monofosforil lípido A; difosforil lípido A, tal como el lípido A de *Escherichia coli* y *Rhodobacter*

sphaeroides. Varias estructuras de lípido A inmunoactivadoras contienen 6 cadenas de acilo. Cuatro cadenas de acilo primarias unidas directamente a los azúcares de glucosamina son cadenas de 3-hidroxiacilo, normalmente de entre 10 y 16 carbonos de longitud. Dos cadenas de acilo adicionales suelen estar unidas a los grupos 3-hidroxi de las cadenas de acilo primarias. El lípido A de *E. coli*, como ejemplo, tiene típicamente cuatro cadenas de 3-hidroxi acilo C14 unidas a los azúcares y una C12 y una C14 unidas a los grupos 3-hidroxi de las cadenas de acilo primarias en la posición 2' y 3', respectivamente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "análogo o derivado del lípido A" se refiere a una molécula que se asemeja a la estructura y la actividad inmunitaria del lípido A, pero que no necesariamente se produce de forma natural en la naturaleza. Los análogos o derivados del lípido A pueden modificarse, por ejemplo, para acortarse o condensarse, y/o para que sus residuos de glucosamina se sustituyan por otro residuo de azúcar de amina, por ejemplo, residuos de galactosamina, para que contengan un 2-desoxi-2-aminogluconato en lugar de la glucosamina-1-fosfato en el extremo reductor, para que tengan un resto de ácido galacturónico en lugar de un fosfato en la posición 4'. Los análogos o derivados del lípido A pueden prepararse a partir del lípido A aislado de una bacteria, por ejemplo, mediante derivación química, o sintetizarse químicamente, por ejemplo, determinando primero la estructura del lípido A preferido y sintetizando análogos o derivados del mismo. Los análogos o derivados del lípido A también son útiles como adyuvantes agonistas de TLR4 (véase, por ejemplo, Gregg KA *et al.*, 2017, MBio 8, eDD492-17, doi: 10.1128/mBio.00492-17). Por ejemplo, un análogo o derivado del lípido A se puede obtener por desacilación de una molécula de lípido A de tipo natural, por ejemplo, por tratamiento alcalino. Los análogos o derivados del lípido A se pueden preparar, por ejemplo, a partir del lípido A aislado de bacterias. Dichas moléculas también se podrían sintetizar químicamente. Otro ejemplo de análogos o derivados del lípido A son las moléculas de lípido A aisladas de células bacterianas que albergan mutaciones, deleciones o inserciones de enzimas implicadas en la biosíntesis del lípido A y/o la modificación del lípido A. MPL y 3D-MPL son análogos o derivados del lípido A que se han modificado para atenuar la toxicidad del lípido A. El lípido A, MPL y 3D-MPL tienen una cadena principal de azúcar sobre la que se unen cadenas largas de ácidos grasos, en donde la cadena principal contiene dos azúcares de 6 carbonos en enlace glucosídico y un resto de fosforilo en la posición 4. Típicamente, de cinco a ocho ácidos grasos de cadena larga (normalmente de 12-14 átomos de carbono) están unidos a la cadena principal de azúcar. Debido a la derivación de fuentes naturales, MPL o 3D-MPL pueden estar presentes como un compuesto o mezcla de varios patrones de sustitución de ácidos grasos, por ejemplo, heptaacilo, hexaacilo, pentaacilo, etc., con longitudes de ácidos grasos variables. Esto también es cierto para algunos de los otros análogos o derivados del lípido A descritos en el presente documento, sin embargo, las variantes sintéticas del lípido A también pueden definirse y ser homogéneas. MPL y su fabricación se describen, por ejemplo, en el documento US 4.436.727. 3D-MPL se describe, por ejemplo, en el documento US 4.912.094B1 y se diferencia de MPL por la eliminación selectiva del residuo acilo 3-hidroximirisístico que está unido por éster a la glucosamina del extremo reductor en la posición 3 (compárese, por ejemplo, la estructura de MPL en la columna 1 frente a 3D-MPL en la columna 6 del documento US 4.912.094B1). En la técnica, a menudo se usa 3D-MPL, aunque a veces se denomina MPL (por ejemplo, la primera estructura en la Tabla 1 de Ireton GC y SG Reed, 2013, anteriormente, se refiere a esta estructura como MPL®, pero en realidad representa la estructura de 3D-MPL). Los ejemplos del lípido A (análogos, derivados) de acuerdo con la invención incluyen MPL, 3D-MPL, RC529 (por ejemplo, el documento EP1385541), PET-lípido A, GLA (adyuvante lipídico de glucopiranosilo, un glucolípido disacárido sintético; por ejemplo, los documentos US20100310602, US8722064), SLA (por ejemplo, Carter D *et al.*, 2016, Clin Transl Immunology 5: e108 (doi: 10.1038/cti.2016.63), que describe un enfoque de estructura-función para optimizar los ligandos de TLR4 para vacunas humanas), PHAD (disacárido hexaacilo fosforilado; cuya estructura es la misma que la de GLA), 3D-PHAD, 3D-(6-acil)-PHAD (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD y 3D(6A)PHAD son variantes sintéticas del lípido A, véase, por ejemplo, avantilipids.com/divisions/adjuvants, que también proporciona estructuras de estas moléculas), E6020 (número CAS 287180-63-6), ONO4007, OM-174 y similares. Para estructuras químicas de ejemplo de 3D-MPL, RC529, PET-lípido A, GLA/PHAD, E6020, ONO4007 y OM-174, véase, por ejemplo, la Tabla 1 en Ireton GC y SG Reed, 2013, anteriormente. Para una estructura de SLA, véase, por ejemplo, la figura 1 en Reed SG *et al.*, 2016, Curr Opin Immunol 41: 85-90. En determinadas realizaciones preferidas, el adyuvante agonista de TLR4 comprende un análogo o derivado del lípido A elegido de 3D-MPL, GLA o SLA.

Los adyuvantes de ejemplo que comprenden un análogo o derivado del lípido A incluyen GLA-LSQ (MPL sintético [GLA], QS21, lípidos formulados como liposomas), SLA-LSQ (MPL sintético [SLA], QS21, lípidos, formulados como liposomas), GLA-SE (MPL sintético [GLA], emulsión de aceite de escualeno/agua), SLA-SE (MPL sintético [SLA], emulsión de aceite de escualeno/agua), SLA-Nanoalumbre (MPL sintético [SLA], sal de aluminio), GLA-Nanoalumbre (MPL sintético [GLA], sal de aluminio), SLA-AF (MPL sintético [SLA], suspensión acuosa), GLA-AF (MPL sintético [GLA], suspensión acuosa), SLA-alumbre (MPL sintético [SLA], sal de aluminio), GLA-alumbre (MPL sintético [GLA], sal de aluminio), y varios de los adyuvantes de la serie GSK ASxx, incluyendo AS01 (MPL, QS21, liposomas), AS02 (MPL, QS21, emulsión de aceite en agua), AS25 (MPL, emulsión de aceite/agua), AS04 (MPL, sal de aluminio) y AS15 (MPL, QS21, CpG, liposomas). Véanse, por ejemplo, los documentos WO 2013/119856, WO 2006/116423, US 4.987.237, U.S. 4.436.727, US 4.877.611, US 4.866.034, US 4.912.094, US 4.987.237, US5191072, US5593969, US 6.759.241, US 9.017.698, US 9.149.521, US 9.149.522, US 9.415.097, US 9.415.101, US 9.504.743, Reed G, *et al.*, 2013, anteriormente, Johnson *et al.*, 1999, J Med Chem, 42:4640-4649, y Ulrich y Myers, 1995, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach; Powell y Newman, Eds.; Plenum: Nueva York, 495-524.

También pueden usarse moléculas no glucolípidas como adyuvantes agonistas de TLR4, por ejemplo, moléculas sintéticas tales como Neoseptina-3, o moléculas naturales tales como LelF, véase, por ejemplo, Reed SG *et al.*, 2016,

anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de la invención, un polinucleótido de la invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH como se describe en el presente documento, un polinucleótido como se describe en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en el presente documento como un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria contra una bacteria gramnegativa de la familia de las *Enterobacteriaceae*.

Como se usan en el presente documento, los términos "inmunógeno" o "inmunogénico" o "antígeno" se usan indistintamente para describir una molécula capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra sí misma al administrarse a un receptor, ya sea sola, junto con un adyuvante o presentada en un vehículo de presentación.

Como se usa en el presente documento, una "respuesta inmunológica" o "respuesta inmunitaria" a un antígeno o composición se refiere al desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular al antígeno o un antígeno presente en la composición.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH como se describe en el presente documento, un polinucleótido como se describe o una composición farmacéutica descrita en el presente documento para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra una infección bacteriana causada por una bacteria gramnegativa de la familia *Enterobacteriaceae*. En determinadas realizaciones, la infección bacteriana es causada por *Staphylococcus saprophyticus* o *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp., *Serratia* spp. o *Pseudomonas* spp. En realizaciones preferidas, la infección bacteriana es causada por *Klebsiella* spp. o *E. coli*. En una realización mucho más preferida, la infección bacteriana es causada por *E. coli*. Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere al uso de un polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH como se describe en el presente documento, un polinucleótido como se describe o una composición farmacéutica descrita en el presente documento como un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria contra *E. coli* o *Klebsiella*, preferentemente *E. coli*.

En realizaciones preferidas, la infección bacteriana, causada por una bacteria gramnegativa de la familia *Enterobacteriaceae* es una infección por *E. coli*, por ejemplo, por ExPEC, más particularmente una infección de las vías urinarias (IVU). En una realización, la invención se refiere al polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH como se describe en el presente documento, un polinucleótido como se describe o una composición farmacéutica descrita en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención o supresión de síntomas y/o secuelas asociadas con una IVU en un sujeto. En determinadas realizaciones, dicha IVU es una IVUr. *E. coli* es uno de los principales agentes causantes de IVU e IVUr que son un importante problema de atención médica en mujeres jóvenes y adultos mayores. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, la infección bacteriana es una IVU o IVUr causada por *E. coli*.

En una realización, la invención se refiere a un método para tratar, prevenir o suprimir síntomas y/o secuelas asociadas con una afección relacionada con enterobacilos en un sujeto que lo necesite. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH como se describe en el presente documento, un polinucleótido como se describe o una composición farmacéutica descrita en el presente documento. Preferentemente, la administración induce una respuesta inmunitaria que es eficaz para tratar o prevenir una afección relacionada con enterobacilos. Preferentemente, la afección relacionada con enterobacilos es una infección del aparato genitourinario, más particularmente una IVU o IVUr.

La invención también se refiere al uso de un polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH como se describe en el presente documento, un polinucleótido como se describe o una composición farmacéutica descrita en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o suprimir una infección bacteriana causada por una bacteria gramnegativa de la familia *Enterobacteriaceae*, preferentemente una infección bacteriana causada por *E. coli*. Más preferentemente, la infección bacteriana es una IVU o IVUr causada por *E. coli*.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención. En determinadas realizaciones, el vector es un plásmido o un vector vírico, preferentemente un plásmido. El vector está preferentemente en forma de ADN, por ejemplo, un plásmido de ADN. En determinadas realizaciones, el vector comprende el polinucleótido de la invención unido operativamente a un promotor, lo que significa que el polinucleótido está bajo el control de un promotor. El promotor puede estar ubicado cadena arriba del polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención, por ejemplo, en un casete de expresión en un plásmido.

La invención se refiere además a un método para la producción de un polipéptido de la invención, comprendiendo el método cultivar una célula recombinante que contiene el polinucleótido que codifica el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH como se describe en el presente documento y/o el vector como se describe en el presente documento, en donde el cultivo tiene lugar en condiciones propicias para la producción del polipéptido.

En determinadas realizaciones, el método comprende además recuperar el polipéptido, que opcionalmente va seguido de la formulación en una composición farmacéutica.

- 5 Preferentemente, se usa una célula de *E. coli*, por ejemplo, un derivado de BL21 de *E. coli*, en el método para producir el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de acuerdo con la invención.

La recuperación del polipéptido incluye preferentemente una etapa de purificación y/o aislamiento que se puede realizar usando métodos de purificación de proteínas convencionales bien conocidos en la técnica. Dichos métodos
10 pueden incluir precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxipatita y cromatografía con lectina.

Los ejemplos típicos para dicha purificación y/o aislamiento pueden utilizar un anticuerpo para la proteína o para una
15 etiqueta His o un líder escindible o cola que se expresa como parte de la estructura proteica. En determinadas realizaciones, el polipéptido descrito en el presente documento tiene una etiqueta His incluida y se purifica mediante métodos tales como la purificación por afinidad IMAC. En determinadas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento no comprenden una etiqueta His, en tales casos, la purificación se realiza mediante cromatografía de intercambio catiónico (cIEX) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).
20

Definiciones

Se citan o se describen diversas publicaciones, artículos y patentes en los antecedentes y a lo largo de la memoria
25 descriptiva; El análisis de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente memoria descriptiva tiene como finalidad proporcionar un contexto para la invención. Dicho análisis no constituye una admisión de que alguno o todos estos asuntos formen parte de la técnica anterior con respecto a cualquier invención divulgada o reivindicada.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen
30 el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. De otro modo, determinados términos citados en el presente documento tienen los significados establecidos en la memoria descriptiva.

Debe tenerse en cuenta que, como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas
35 en singular "un", "una", y "el/la" incluyen referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

A lo largo de esta descripción y las siguientes reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo
40 contrario, el término "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un integrante o etapa, o grupo de integrantes o etapas, pero no la exclusión de ningún otro integrante o etapa, o grupo de integrantes o etapas. Cuando se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" puede sustituirse por la expresión "que contiene" o "que incluye" o, a veces, cuando se usa en el presente documento, por la expresión "que tiene".

Cuando se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no
45 especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o pasos que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación. Cualquiera de las expresiones mencionadas anteriormente de "que comprende", "que contiene", "que incluye" y "que tiene", siempre que se usen en el presente documento en el contexto de un aspecto o realización de la invención, se pueden reemplazar por el término "que consiste en" o "que consiste esencialmente en"
50 para variar los alcances de la divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término conjuntivo "y/o" entre múltiples elementos enumerados se entiende
55 que abarca tanto las opciones individuales como las combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos se unen mediante "y/o", una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y del segundo elemento juntos. Se entiende que cualquiera de estas opciones se encuentra dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en el presente documento. También se entiende que la aplicabilidad concurrente de más de una de las opciones se encuentra dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o".
60

Como se usa en el presente documento, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material
65 no tóxico que no interfiere con la eficacia de una composición de acuerdo con la invención o la actividad biológica de una composición de acuerdo con la invención. Un "portador farmacéuticamente aceptable" puede incluir cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizante, solubilizante, aceite, lípido, vesícula que contiene lípidos, microesfera, encapsulación liposomal u otro material bien conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del portador farmacéuticamente aceptable dependerán de la vía

de administración para una aplicación particular. De acuerdo con realizaciones particulares, en vista de la presente divulgación, cualquier portador farmacéuticamente aceptable adecuado para su uso en una vacuna se puede usar en la invención. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, agua esterilizada, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos, así como estabilizantes, por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA) u otras proteínas adecuadas y azúcares reductores.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un principio o componente activo que provoca la respuesta biológica o médica deseada en un sujeto. Una cantidad eficaz se puede determinar empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el fin establecido. Por ejemplo, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos.

Como se usa en el presente documento, "sujeto" o "paciente" significa cualquier animal, preferentemente un mamífero, mucho más preferentemente un ser humano, que será o ha sido vacunado mediante un método o composición de acuerdo con una realización de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "mamífero" abarca cualquier mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitación, vacas, caballos, ovejas, cerdos, gatos, perros, ratones, ratas, conejos, cobayas, monos, seres humanos, etc., más preferentemente un ser humano. En determinadas realizaciones, un sujeto es un adulto humano. Como se usa en el presente documento, la expresión "adulto humano" se refiere a un ser humano que tiene 18 años o más. En determinadas realizaciones, un sujeto tiene menos de 18 años, por ejemplo, 0-18 años, por ejemplo, 9-18 años o 12-18 años. En determinadas realizaciones, un sujeto es un sujeto humano de aproximadamente 18 a aproximadamente 50 años. En determinadas realizaciones, un sujeto es un ser humano de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 años, por ejemplo, 50-85 años, 60-80 años, 50 años o más, 55 años o más, 60 años o más, 65 años o más, 70 años o más, 75 años o más, 80 años o más, 85 años o más. En algunas realizaciones del presente documento, el sujeto no tiene más de 85 años, no tiene más de 80 años, no tiene más de 75 años. En determinadas realizaciones, un sujeto humano es un hombre. En determinadas realizaciones, un sujeto humano es una mujer.

Como se usa en el presente documento, una "IVU" significa una infección del riñón, la vejiga, el uréter o la uretra. Los síntomas de una IVU pueden incluir uno o más de sensación de ardor al orinar, necesidad frecuente o intensa de orinar, vaciado incompleto de la vejiga, orina con aspecto y/u olor anómalo, aumento de glóbulos blancos en la orina, sensación de cansancio o temblores, sensación de desorientación, fiebre o escalofríos, malestar general, dolor o presión en la espalda, abdomen inferior, pelvis o vejiga. Sin embargo, en algunos pacientes los síntomas pueden estar ausentes o ser inespecíficos. Las secuelas de una IVU pueden incluir complicaciones sistémicas tales como enfermedad invasiva y septicemia. En determinadas realizaciones, una IVU está documentada clínica y/o microbiológicamente, por ejemplo, confirmada con cultivo bacteriano de orina y/o con métodos moleculares u otros. En determinadas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano que ha tenido previamente o tiene actualmente una IVU. En determinadas realizaciones, el sujeto ha tenido una IVU en los últimos dos años, el último año o los últimos 6 meses. En determinadas realizaciones, el sujeto ha tenido o tiene actualmente una IVU recurrente (IVUr). Como se usa en el presente documento, una "IVUr" significa al menos dos infecciones en seis meses o al menos tres IVU en un año. En determinadas realizaciones, un sujeto al que se administra el polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH de la invención, el complejo FimCH de la invención o una composición de la invención, ha padecido al menos dos IVU en los últimos dos años, en el último año o en los últimos seis meses. En determinadas realizaciones, el sujeto ha padecido una IVU complicada. Como se usa en el presente documento, una "IVU complicada" significa una IVU asociada con una afección, tal como anomalías estructurales o funcionales del aparato genitourinario o la presencia de una enfermedad subyacente. En determinadas realizaciones, una IVU conduce a un número elevado de glóbulos blancos en la orina u otras anomalías en la orina. En determinadas realizaciones, un sujeto con IVU tiene una cantidad de bacterias en la orina, es decir, la orina no es estéril, por ejemplo, un recuento de células bacterianas de al menos aproximadamente 10 células/ml, al menos aproximadamente 100 células/ml, al menos aproximadamente 10³ células/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 10⁴ células/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 10⁵ células/ml.

Como se usa en el presente documento, una "respuesta inmunológica" o "respuesta inmunitaria" a un antígeno o composición se refiere al desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular al antígeno o un antígeno presente en la composición.

A menos que se indique de otro modo, la expresión "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" cuando se usa en asociación con un valor numérico (por ejemplo, aproximadamente 10) significa preferentemente que el valor puede ser el valor dado (de 10) más o menos el 10 %, preferentemente más o menos el 5 % del valor.

Los términos "homología", "identidad de secuencia" y similares se usan indistintamente en el presente documento. La identidad de secuencia se define en el presente documento como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptidos o proteínas) o dos o más secuencias de ácidos nucleicos (polinucleótidos), según lo determinado por comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea el caso, según lo determinado por la

coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. La "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se determina mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. La "identidad" y la "similitud" se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos.

La "identidad de secuencia" y la "similitud de secuencia" se pueden determinar mediante la alineación de dos secuencias de péptidos o dos secuencias de nucleótidos usando algoritmos de alineación global o local, dependiendo de la longitud de las dos secuencias. Las secuencias de longitudes similares se alinean preferentemente usando un algoritmo de alineación global (por ejemplo, Needleman Wunsch) que alinea las secuencias de manera óptima en toda la longitud, mientras que las secuencias de longitudes sustancialmente diferentes se alinean preferentemente usando un algoritmo de alineación local (por ejemplo, Smith Waterman). Las secuencias pueden denominarse entonces "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando (al alinearse de forma óptima, por ejemplo, por los programas GAP o BESTFIT usando parámetros predeterminados) comparten al menos un determinado porcentaje mínimo de identidad de secuencia (como se define a continuación). GAP usa el algoritmo de alineación global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias sobre toda su longitud (longitud completa), maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de huecos. Una alineación global se usa adecuadamente para determinar la identidad de secuencia cuando las dos secuencias tienen longitudes similares. Generalmente, se usan los parámetros predeterminados de GAP, con una penalización de creación de huecos = 50 (nucleótidos)/8 (proteínas) y penalización de extensión de huecos = 3 (nucleótidos)/2 (proteínas). Para los nucleótidos, la matriz de puntuación predeterminada usada es nwsgapdna y, para las proteínas, la matriz de puntuación predeterminada es Blosum62 (Henikoff y Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Las alineaciones de secuencias y las puntuaciones para el porcentaje de identidad de secuencia pueden determinarse usando programas informáticos, tal como el paquete GCG Wisconsin, Versión 10.3, disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 EE. UU., o usando software de código abierto, tal como el programa "needle" (que usa el algoritmo global Needleman Wunsch) o "water" (que usa el algoritmo local Smith Waterman) en EmbossWIN versión 2.10.0, usando los mismos parámetros que para GAP anteriormente, o usando la configuración predeterminada (tanto para "needle" como para "water" y tanto para alineaciones de proteínas como de ADN, la penalización de apertura de huecos predeterminada es 10,0 y la penalización de extensión de huecos predeterminada es 0,5; las matrices de puntuación predeterminadas son Blosum62 para proteínas y DNABFull para ADN). Cuando las secuencias tienen longitudes totales sustancialmente diferentes, se prefieren las alineaciones locales, tales como las que usan el algoritmo Smith Waterman.

Como alternativa, el porcentaje de similitud o identidad puede determinarse mediante una búsqueda en bases de datos públicas, usando algoritmos tales como FASTA, BLAST, etc. Por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico y de proteína de la presente invención pueden usarse además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Con el programa NBLAST, pueden realizarse búsquedas BLAST de nucleótidos, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Con el programa BLASTx se pueden realizar búsquedas BLAST de proteínas, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTx y BLASTn). Véase la página de inicio del National Center for Biotechnology Information en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

Tabla 1: Secuencias

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
Secuencia de FimH _{LD} (FimH _{LD} 23-10)	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIF CHNDYPETITDYVTLQRGSA YGGVLSNFSGTVKYS GSSYPFPT TSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLT PVSSAGGVAIKAGSLIAVL ILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTG	1
Secuencia de FimH _t	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIF CHNDYPETITDYVTLQRGSA YGGVLSNFSGTVKYS GSSYPFPT TSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLT PVSSAGGVAIKAGSLIAVL ILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVT PDYPGSPVPIPLTVYCAKSNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRNGTIIIPANNTVSLGAVGTS AVSLGLTANYAR TGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ	2

(continuación)

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
FimC de longitud completa	GVALGATRVITYPAGQKQVQLAVTNNDENSTYLIQSWVENADGV KDGRFIVTPPLFAMKGKKENTLRILDATNNQLPQDRESLFWMN VKALPSMDKSKLTENTLQLAIIISRIKLYYRPAKLALPPDQAAE KLRFRRSANSRLTLINPTFYLLTVTELNAGARVLENALVPPMGE STVKLPSDAGSNITYRTINDYGALTPKMTGVME	3
Ejemplo de secuencia de FimH 23-10 (longitud completa)	MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYV NLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAVG GVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALY LTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYAN NDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLG YYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIIPANNT VSLGAVGTSVAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ	4
SEQ ID NO: 2 del documento US 6.500.434 (ejemplo de secuencia de FimH de longitud completa)	MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYV NLAPVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAVG GVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALY LTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYAN NDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYRGSVPIPLTVYCAKSQNLG YYLSGTHADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIIPANNT VSLGAVGTSVAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVTQ	5
SEQ ID NO: 29 del documento US 6.737.063 (ejemplo de secuencia de FimH con truncamiento en el extremo N)	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQNLVVDLSTQIF CHNDYPETITDYVTLQRGSAVGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPT TSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTTPVSSAGGLVIKAGSLIAVL ILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVT LPDYRGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTHADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRNGTIIPTNNTVSLGAVGTSVAVSLGLTANYAR TGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ	6
Ejemplo de una secuencia de FimH _{LD}	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQNLVVDLSTQIF CHNDYPETITDYVTLQRGSAVGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPT TSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTTPVSSAGGLVIKAGSLIAVL ILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG	7

Se describen otros ejemplos de secuencias para polipéptidos FimH en el documento US6.737.063, por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO: 23-45 o 55 en el mismo,

Ejemplos

Los siguientes ejemplos de la invención tienen como objetivo ilustrar aún más la naturaleza de la invención. Debe entenderse que los siguientes ejemplos no limitan la invención y que el alcance de la invención se determinará mediante las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Diseño de variantes novedosas - datos de SPR

Para comprender el impacto de los cambios conformacionales de FimH en la eficacia de la vacuna, se diseñaron varias variantes de FimH que contienen diferentes mutaciones que podrían bloquear potencialmente la proteína en el estado de baja afinidad, con el objetivo de identificar la mejor variante de FimH que induzca anticuerpos funcionales capaces de reducir la adhesión bacteriana y la colonización de la vejiga.

Materiales y métodos

Diseño y expresión de FimH

FimC y FimH se expresaron en un vector pET-DUET usando secuencias de señal heterólogas para determinar la expresión en el periplasma y una etiqueta His en el extremo C de FimC para la purificación por afinidad mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). La expresión se indujo usando IPTG y la proteína se extrajo y se purificó mediante purificación IMAC (Talon).

SPR

Para obtener una visión detallada de la afinidad de unión y la cinética de la interacción de las variantes del dominio de

lectina de FimH con el ligando n-heptil- α -D-manopiranosido, se realizaron mediciones de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés). En resumen, todas las variantes de FimH se valoraron en la superficie del ligando 5 de manósido (Rabbani S *et al.*, J Biol. Chem., 2018, 293(5): 1835-1849) con las concentraciones máximas de 3 o 10 μ M en el HBS-N (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %). Las proteínas se inyectaron de 0,12 a 10 μ M o de 0,036 a 3,0 μ M usando una cinética de inyección de ciclo único.

Resultados

Se diseñaron varias variantes de FimH con el objetivo de encontrar una variante del dominio de lectina de FimH que pudiera inducir anticuerpos inhibidores funcionales, evitando así la unión bacteriana a las células de la vejiga y proporcionando una amplia cobertura. Para optimizar las posibilidades de encontrar una variante adecuada del dominio de lectina de FimH, se seleccionaron variantes con un modo de acción previsto diferente.

Los mutantes FimH_Q133K y FimH_R60P descritos previamente tienen una mutación en los residuos que interactúan con la manosa en el sitio de unión. Se predice que estas mutaciones influyen directamente en la interacción de unión con la manosa. Estos mutantes se tomaron como controles positivos. El mutante doble R60P Q133K se tomó para comprobar los posibles efectos mejorados. Además, el dominio de lectina de FimH de tipo natural (WT) se tomó como control negativo. Se crearon varios mutantes de FimH adicionales (incluidos los denominados "Mutante 1" y "Mutante 2" en el presente documento) y se ensayaron como candidatos en el panel con el objetivo de obtener anticuerpos inhibidores funcionales.

Primero, se evaluó la afinidad de las variantes para unirse a la manosa usando SPR. Los resultados se presentan en la tabla 2. Como era de esperar, las variantes del dominio de lectina que tienen mutaciones en el sitio de unión a manosa de FimH (Q133K y R60P Q133K) no se unieron al manósido en absoluto. El mutante R60P mostró una baja afinidad por el manósido, como se esperaba.

F142V todavía mostró cierta afinidad por el manósido, lo que indica que esta mutación no eliminó por completo la unión al manósido. En las variantes del dominio de lectina de FimH que comprenden la sustitución F144V, la unión al manósido se eliminó por completo. Fue sorprendente ver que había una diferencia entre F142V y F144V en la unión al manósido dada la proximidad muy cercana de las posiciones en la secuencia de aminoácidos en comparación con la mutación F144V.

Tabla 2: Mediciones de afinidad de las variantes de FimH-LD al manósido

Variante	Afinidad*
F144 V	Sin Unión
F142 V	Afinidad media
Mutante 1	Afinidad media
Mutante 2	Baja afinidad
R60P	Baja afinidad
R60P-Q133K	Sin Unión
Q133K	Sin Unión
FimH LD wt	Alta afinidad

* *Baja afinidad* $KD > 1000$ nM; *Afinidad media* KD 100-1000 nM; *Alta afinidad* $KD < 100$ nM

Ejemplo 2: Capacidad de inducir anticuerpos inhibidores

Se ha demostrado que los anticuerpos generados contra FimH en la conformación de baja afinidad son capaces de bloquear la célula bacteriana y reducir la formación de colonias en la vejiga. Para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos inducidos por las diferentes variantes de FimH bloqueadas en la conformación de baja afinidad se usó un ensayo de inhibición de adhesión (AIA).

Materiales y métodos

Inmunización

Ratas Wistar recibieron 4 inmunizaciones intramusculares (i.m.) los días 0, 7, 10 y 18 con las variantes de FimH descritas anteriormente (60 μ g de cada variante/dosis) combinadas con un adyuvante no Freund (modelo de rata Speedy de 28 días, Eurogentec). La funcionalidad de los anticuerpos séricos se investigó el día 0 (antes de la inmunización) y el día 28 (después de la inmunización) mediante el ensayo de inhibición de la adhesión (AIA), como se describe a continuación.

Ensayo de inhibición de la adhesión (AIA)

Las bacterias (J96 de *E. coli*) se marcaron con un isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las bacterias marcadas se incubaron con células uroteliales de vejiga (línea celular 5637) durante 1 h a 37 °C. El % de bacterias adherentes se midió mediante citometría de flujo. Para evaluar la inhibición sérica, las bacterias se incuban previamente con muestras de suero durante 30 minutos a 37 °C y a continuación se mezclan con células 5637.

ELISA

Las placas de 96 pocillos se recubren durante una noche con 1 ug/ml de FimH. Después del lavado, los pocillos recubiertos se incuban con tampón de bloqueo [solución salina tamponada con fosfato (PBS) + albúmina sérica bovina (BSA) al 2 %] durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS + Tween 20 al 0,05 %, se añade suero a las placas que a continuación se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se añade anticuerpo anti rata de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido en PBS con BSA al 2 % a cada pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado final, la reacción se desarrolla con sustrato de tetrametilbencidina. La reacción se detiene con ácido fosfórico 1 M y se mide la absorbancia a 450 nm.

Resultados

Los valores inhibidores de anticuerpos séricos se calcularon como la mitad de la concentración inhibidora máxima (CI50) basándose en un modelo de regresión logística de 4 parámetros. Además, los niveles de anticuerpos séricos inducidos por diferentes variantes de FimH (IgG total) se evaluaron mediante ELISA. Los valores de CE50, definidos como la mitad de la concentración eficaz máxima, se calcularon basándose en curvas de valoración duplicadas de 12 etapas que se analizaron con un modelo de regresión no lineal 4PL.

La evaluación de la magnitud de los anticuerpos inhibidores inducidos por cada una de las variantes de FimH mostró que FimH-23-10_F144V fue capaz de inducir los niveles más altos de anticuerpos funcionales (figura 1), lo que fue sorprendente y completamente impredecible antes de la presente invención. Basándose en este resultado, el dominio de lectina de FimH que comprende la sustitución F144V fue seleccionado como el candidato principal.

Ejemplo 3: Funcionalidad de los anticuerpos

La funcionalidad de los anticuerpos se evaluó en un análisis de interferometría de biocapa (Octet, Pall Fortebio) usando preparaciones de IgG purificada para evaluar si había anticuerpos inhibidores presentes. Brevemente, se mezclaron 4 concentraciones diferentes de IgG purificada (entre 0-125 microgramos/ml) con una variante de FimH como se describe en el presente documento. Después de la mezcla, la capacidad de la proteína del dominio de lectina de FimH se evaluó para determinar la capacidad de unión a un biosensor que se inmovilizó previamente con monomanósido marcado con biotina (usando la química de biotina-estreptavidina). Se midió la asociación y la disociación durante 600 segundos y se calculó y se comparó la respuesta (en nanómetros (nm)) durante la asociación. Esto se hizo con el manósido en comparación con los controles en blanco para evaluar la capacidad de las variantes de FimH de inhibir la unión de FimH a manosa.

Resultados

Los cambios en la conformación del sitio de unión de FimH (que dan como resultado una unión de afinidad baja, media o alta de FimH a los manósidos) desempeñan una función importante en la unión bacteriana a las células uroepiteliales. Se ha sugerido que los anticuerpos contra la conformación que tiene baja afinidad por la manosa tendrían un efecto inhibidor de la adhesión bacteriana. Para analizar esta sugerencia y comprender mejor el impacto de los cambios conformacionales de FimH en la eficacia de la vacuna, se cribó la IgG purificada de sueros de ratas inmunizadas con las variantes del dominio de lectina de FimH para determinar su capacidad para reducir la unión de FimH a un manósido simple (monomanosa-biotina) mediante interferometría de biocapa (BLI).

El cribado BLI para determinar la presencia de anticuerpos inhibidores en sueros de ratas inmunizadas con variantes del dominio de lectina de FimH mostró que FimH-23-10_F144V era capaz de inhibir la unión de proteínas del dominio de lectina de FimH de alta y baja afinidad al monomanósido inmovilizado (datos no mostrados).

Ejemplo 4: Capacidad de unión de los mAb inhibidores caracterizados 475 y 926

Las mutaciones en el dominio de lectina de FimH pueden provocar la pérdida de epítomos que son cruciales para generar una respuesta inmunitaria fuerte y funcional, tal como los epítomos que están presentes en el sitio de unión de FimH. Para garantizar que la integridad del sitio de unión no se viera comprometida en las mutaciones descritas en el presente documento, se evaluó la unión de los anticuerpos monoclonales (mAb) mAb475 y mAb926 a los dominios de lectina de FimH mutantes. mAb475 y mAb926 reconocen epítomos superpuestos pero distintos en el dominio de lectina de FimH dentro del sitio de unión a manosa de FimH (Kisiela *et al.* 2013 y 2015).

Resultados

- Los dominios de lectina de FimH mutados se han descrito previamente en el documento WO02102974. El documento WO02102974 describe una lista extensa de posibles mutaciones, en su mayoría no especificadas (se sugieren 65 posibles sitios de mutación en el dominio de lectina de FimH, que tiene aproximadamente 159 aminoácidos de longitud). Sin embargo, el documento WO02102974 indica que los dominios de lectina de FimH que tienen una sustitución de aminoácidos en la posición 54, 133 o 135 son los candidatos más prometedores, FimH_Q133K se menciona explícitamente como una opción altamente preferida. Por lo tanto, fue bastante sorprendente que FimH-23-10_Q133K no fuera reconocido por el mAb475 funcional, lo que indica problemas de integridad del sitio de unión (Tabla 3). Por el contrario,
- 10 FimH-23-10_F144V fue reconocido tanto por mAb475 como por mAb926, lo que indica que el sitio de unión permaneció completamente intacto (Tabla 3).

Tabla 3: Capacidad de unión de los mAb inhibidores caracterizados 475 y 926

Variante	Integridad del sitio de unión	
	mAb 475	mAb 926
F144 V	Unión	Unión
R60P	Unión	Unión
R60P-Q133K	Sin Unión	Unión
Q133K	Sin Unión	Unión
FimH LD wt	Unión	Unión

- 15 Por lo tanto, en conclusión, de todas las variantes de FimH, FimH_F144V mostró una afinidad fuertemente reducida por la manosa (lo que indica que la variante estaba en la conformación de baja afinidad por la manosa) y fue capaz de inhibir la unión de proteínas del dominio de lectina de FimH de alta y baja afinidad al mono-manósido inmovilizado. Además, FimH_F144V indujo los niveles más altos de anticuerpos funcionales de todas las mutaciones ensayadas y se demostró que tenía un sitio de unión intacto. Este mutante también se pudo fabricar en un complejo FimCH. En
- 20 conclusión, el dominio de lectina de FimH con una valina en la posición 144 tiene una combinación sorprendente de características que lo hacen muy adecuado como componente de vacuna, es decir, mejor que el tipo natural en el que hasta ahora se han centrado los esfuerzos para desarrollar una vacuna basada en FimH, y mejor que las demás variantes ensayadas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH, en donde el dominio de lectina de FimH comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina (V), isoleucina (I), leucina (L), glicina (G), metionina (M) y alanina (A) en la posición que corresponde a la posición 144 en la SEQ ID NO: 1.
2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una mutación y en donde la mutación es una sustitución F144V.
3. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el dominio de lectina de FimH tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, preferentemente en donde el dominio de lectina de FimH comprende la SEQ ID NO: 1, y en donde el residuo de fenilalanina en la posición 144 está sustituido por valina.
4. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido comprende además un dominio de pilina de FimH.
5. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido es una FimH de longitud completa que tiene al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, preferentemente en donde la FimH comprende la SEQ ID NO: 2, y en donde el residuo de fenilalanina en la posición 144 está sustituido por valina.
6. Un complejo que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 y FimC (FimCH).
7. Un polinucleótido que codifica el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
8. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, un complejo de acuerdo con la reivindicación 6, o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición comprende además un adyuvante.
10. Un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, un complejo de acuerdo con la reivindicación 6, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7 o una composición farmacéutica acuerdo con la reivindicación 8 o 9, para su uso como un medicamento.
11. Un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, un complejo de acuerdo con la reivindicación 6, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7 o una composición farmacéutica acuerdo con la reivindicación 8 o 9, para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra una bacteria de la familia de *Enterobacteriaceae*.
12. El polipéptido, polinucleótido, complejo o composición farmacéutica para un uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la bacteria es *E. coli* o *Klebsiella*, preferentemente *E. coli*.
13. Un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, un complejo de acuerdo con la reivindicación 6, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7 o una composición farmacéutica acuerdo con la reivindicación 8 o 9, para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección de las vías urinarias causada por *E. coli* en un sujeto.
14. Un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, un complejo de acuerdo con la reivindicación 6, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7 o una composición farmacéutica acuerdo con la reivindicación 8 o 9, para su uso en un método para tratar o prevenir una afección relacionada con enterobacilos en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz del polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, de un complejo de acuerdo con la reivindicación 6, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7 o de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o 9.
15. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7.
16. Un método para producir un polipéptido que comprende un dominio de lectina de FimH, que comprende expresar el polipéptido a partir de una célula recombinante que contiene el polinucleótido de la reivindicación 7 y/o el vector de la reivindicación 15, comprendiendo además opcionalmente el método recuperar y purificar el polipéptido, lo que opcionalmente va seguido de la formulación en una composición farmacéutica del polipéptido.

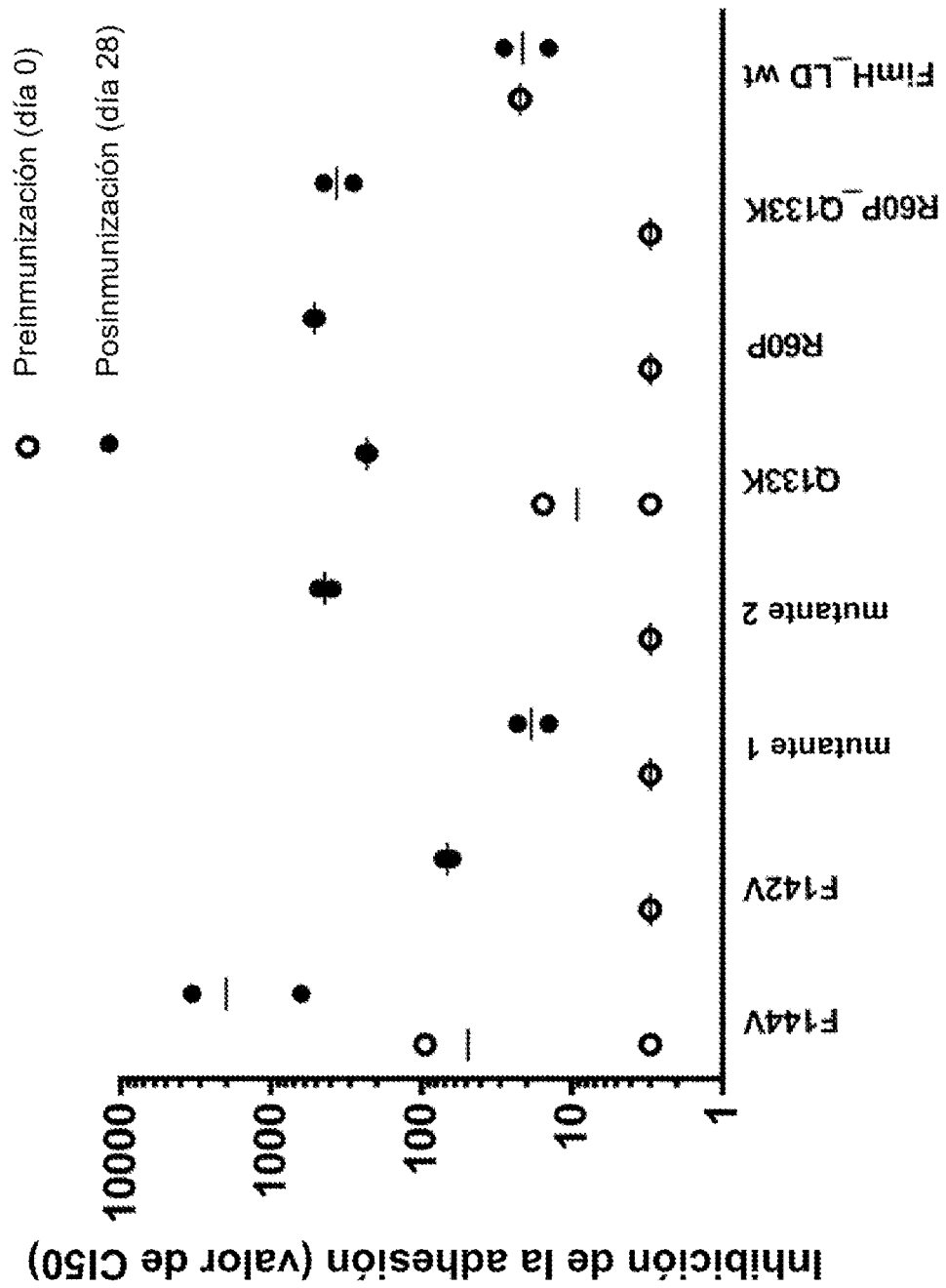


FIG. 1