

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 257**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2017** **PCT/JP2017/016284**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017** **WO17188215**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2017** **E 17789497 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2022** **EP 3450556**

54 Título: **Péptido que inhibe la colonización por bacterias patógenas e inhibidor de la colonización que incluye el mismo**

30 Prioridad:

27.04.2016 JP 2016089902

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2022

73 Titular/es:

OSAKA UNIVERSITY (50.0%)
1-1, Yamadaoka
Suita-shiOsaka 565-0871, JP y
BIKENBIOMICS CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

NAKAMURA, SHOTA;
KAWAHARA, KAZUKI;
OKI, HIROYA;
YOSHIDA, TAKUYA;
OHKUBO, TADAYASU;
KOBAYASHI, YUJI;
MARUNO, TAKAHIRO;
MOTOOKA, DAISUKE;
MATSUDA, SHIGEAKI;
KODAMA, TOSHIO;
IIDA, TETSUYA;
TSUJINO, YASUMITSU y
FUKAKUSA, SHUNSUKE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 913 257 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

Péptido que inhibe la colonización por bacterias patógenas e inhibidor de la colonización que incluye el mismo

Campo técnico

La presente invención se refiere a péptidos novedosos, más particularmente a péptidos que inhiben la colonización de bacterias patógenas en órganos digestivos y a un inhibidor de la colonización que contiene el péptido.

Técnica anterior

En los últimos años, se han descubierto una serie de bacterias patógenas que causan enfermedades de los órganos digestivos. Por ejemplo, se sabe que la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), que es un tipo de bacteria patógena con toxicidad intestinal, invade el tracto digestivo de los seres humanos a través del agua o los alimentos y causa diarrea parecida a la del cólera. Las enfermedades infecciosas por ETEC se han convertido en un problema grave entre las personas que viven en los países en desarrollo y los viajeros que visitan esas regiones, y se estima que alrededor de 200 millones de personas al año se infectan por todo el mundo y aproximadamente 380.000 personas, incluidos principalmente niños menores de 5 años, mueren (Documento de no patente 1). Una encuesta estadística realizada en un centro de cuarentena en el aeropuerto de Osaka en Japón, notificaba que alrededor del 8% de los viajeros japoneses que manifestaban diarrea, estaban infectados con ETEC (Documento de no patente 2).

Como primer paso para la expresión patógena de ETEC, ésta debe adherirse a las células epiteliales del intestino delgado y colonizarlas, y los factores de colonización (CFs, del inglés "colonization factors") desarrollan su función. Hasta la fecha, se han notificado al menos veinticinco CFs, tales como el antígeno del factor de colonización 1 (CFA/I), el antígeno de superficie de *E. coli* 1 (CS1), el presunto factor de colonización 071 (PCF071) y similares (Documento de no patente 3). Por la acción de esos factores patógenos, cuando ETEC se adhiere a las células epiteliales del intestino delgado del hospedador, forma biopelículas, microcolonias y similares y las coloniza. Posteriormente, como segundo paso, ETEC produce la toxina intestinal termolábil (LT) o la toxina intestinal resistente al calor (ST) y desarrolla la patogenicidad.

Casi todos los CFs que tiene ETEC son factores de colonización ciliar, y se clasifican en varios grupos dependiendo de la secuencia de aminoácidos del componente constituyente y la característica de inmunogenicidad o similar (Documento de no patente 3). Por ejemplo, CFA/I, CS1, CS2, CS4, CS5, CS7, CS14, CS17, CS19 y PCF071 forman pili pertenecientes a la clase de tipo 5, mientras que CS12, CS18, CS20, CS26, CS27 y CS28 forman pili pertenecientes a la clase de tipo 1b. Además de estos, CS13, CS15, CS22 y CS23, o CS3 y CS6 se agrupan de manera similar, respectivamente. Las estructuras y naturalezas de estos CFs aún se desconocen en muchos aspectos, pero estos CFs tienen componentes constituyentes similares y están constituidos principalmente por proteínas chaperonas presentes en el periplasma de *E. coli*, subunidades constituyentes principales del pilus (pilina mayor), un pequeño número de subunidades contenidas en el pilus (pilina menor) y las proteínas Usher de la membrana externa, y los pili se forman por la vía Chaperona-Usher (Documento de no patente 3). Por el contrario, CFA/III (CS8) y Longus (CS21) forman pili clasificados como de tipo IV, y proporcionan la estructura del pilus y el mecanismo de formación del pilus diferentes de los de la vía Chaperona-Usher. CS10 y CS11 se han descrito como otros CFs, pero la estructura de sus pili aún se desconoce en muchos aspectos.

Una proteína Tia de la membrana externa identificada a partir de la cepa ETEC H10407 se conoce como un factor de colonización no ciliar expresado por ETEC, y la proteína se une al proteoglicano en la superficie de la célula hospedadora (Documento de no patente 4). Además, también EtpA identificado a partir de la cepa ETEC H10407 se conoce como un factor de colonización no ciliar, expresado por ETEC. Se ha sugerido que EtpA se une a una región altamente conservada de la proteína flagelina y puede unir el cuerpo microbiano y la superficie de la célula hospedadora (Documento de no patente 5).

Generalmente, cada cepa de ETEC posee de 1 a 3 tipos de CFs y también posee varios factores de colonización secretores (Documento de no patente 6). Por lo tanto, el desarrollo de medios de tratamiento tales como la vacunación, es difícil por razones como la diversidad del mecanismo de control espacial y temporal de la expresión de acuerdo con los entornos alrededor de cada CF, además, la introducción de variaciones dependientes de la cepa en el antígeno de superficie y similares, además de la complejidad de la combinación. Actualmente, como antígeno candidato para el desarrollo de vacunas, se considera la toxina LT producida por casi todas las ETECs, pero debido a su toxicidad, existe una restricción en la dosis de administración oral o similar, y en los últimos años una variante obtenida mediante la sustitución del aminoácido en el sitio activo, se ha estudiado como antígeno alternativo. También se considera un uso similar para ST, pero es un problema que el tamaño molecular (péptido que consiste en aproximadamente 20 residuos) sea pequeño y es difícil provocar una respuesta inmune (Documento de no patente 7). También se ha avanzado en el desarrollo de una vacuna que utiliza cada factor de colonización como antígeno. Debido a que es necesario diseñar para causar una inmunidad amplia, la vacuna actual más efectiva es una vacuna de ETEC viva o inactivada que utiliza CFA/I, CS3, CS5, CS6 y una cepa que produce la toxina intestinal LT (Documento de no patente 7 y 8). Esas vacunas son aplicables a cada grupo de pili formado principalmente por la vía Chaperona-Usher y se cree que tienen un efecto sobre el 80% de las cepas clínicas de ETEC.

Lista de referencias

Bibliografía de no patentes

- [Bibliografía de no patente 1] Qadri, F. et al. Clin. microbiol Rev. 2005, 18, 465-483.
- [Bibliografía de no patente 2] Abe, H. et al. J. Diar. Dis. Res. 1984, 2, 83-87.
- 5 [Bibliografía de no patente 3] Madhavan, T. V. et al. Adv. Appl. Microbiol. 2015, 90, 155-197.
- [Bibliografía de no patente 4] Fleckenstein, J. M. et al. Infect. Immun. 2002, 70, 1530-1537.
- [Bibliografía de no patente 5] Roy, K. et al. Nature 2009, 457, 594-598.
- [Bibliografía de no patente 6] Mentzer, A. et al. Nat. Genetics 2014, 46, 1321-1326.
- [Bibliografía de no patente 7] Sjöling, A. et al. Expert Rev. Vaccines 2015, 4, 551-560.
- 10 [Bibliografía de no patente 8] Fleckenstein, J. M. et al. Microbes and infections 2010, 12, 89-98.

Compendio de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Problema técnico

- Hasta la fecha no se han desarrollado vacunas contra ETEC efectivas. Están progresando los estudios de vacunas contra ETEC vivas o inactivadas que utilizan CFA/I, CS3, CS5, CS6 y una cepa que produce la toxina intestinal LT, como vacunas candidatas más prometedoras. Sin embargo, no hay resultados contra las cepas de ETEC que contienen factores de colonización o toxinas no contenidas en esa vacuna. En particular, no es adecuado para cepas que forman pili de tipo IV y que producen CFs que tienen estructuras y características de pili diferentes de los CFs contenidos en las vacunas inactivadas descritas anteriormente. En particular, longus (CS21) ha sido identificado a partir de ETECs en un área amplia y prevalece en regiones que incluyen América Latina, Medio Oriente y África del Norte (Isidean SD et al. Vaccine 2011, 29, 6167-6178). Con la vacuna inactivada descrita anteriormente, es difícil inhibir la infección de cepas que portan tales factores de colonización. También existe la dificultad de que una inactivación de las cepas no provoque inmunidad frente a los factores patógenos secretores, y también existe el problema de que es difícil inducir una inmunidad a largo plazo. Para resolver esos problemas, se considera identificar una proteína altamente conservada que se expresa en la superficie de ETEC de forma amplia y producir una vacuna usando esa proteína como antígeno, sin embargo, tales proteínas aún no se han descubierto.
- 15
- 20
- 25

- Por lo tanto, se cree que es realista y más eficaz realizar una inmunización con múltiples antígenos que muestran los detalles de la estructura y el mecanismo de colonización de los factores de colonización de ETEC a nivel molecular e identificar los epítomos conservados, en lugar de buscar e identificar la proteína. Además, si se aclara el mecanismo de colonización, también es posible el desarrollo de un inhibidor de la colonización.
- 30

La presente invención se ha realizado en vista de los problemas anteriores, y un objeto de la misma es poder evitar que las bacterias que tienen un factor de colonización, colonicen los órganos digestivos.

Solución del problema

- Los presentes inventores han investigado intensamente y, como resultado, han encontrado un mecanismo por el que bacterias particularmente patógenas que producen pili de tipo IVb, entre las bacterias, colonizan los órganos digestivos y han logrado producir un péptido novedoso que inhibe la colonización de las bacterias, basándose en el mecanismo.
- 35

- En concreto, el péptido según la presente invención se caracteriza porque comprende un primer dominio que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 5 y 23, y es capaz de unirse a la pilina menor de los pili de tipo IVb, y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos conectada a través de una secuencia enlazadora a dicho primer dominio y es capaz de trimerización, en donde dicho segundo dominio tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que repite de 4 a 10 veces la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8.
- 40

- Las bacterias que producen los pili de tipo IVb se vuelven capaces de adherirse y colonizar una célula diana mediante la unión de proteínas secretoras generadas por las propias bacterias, a los sitios de unión de proteínas secretoras de la pilina menor, ubicada en la parte superior de la subunidad constituyente principal (pilina mayor) de los pili de tipo IVb, aunque las bacterias no pueden unirse al receptor de la célula diana en los órganos digestivos y similares, solo por los pili. Por el contrario, el péptido según la presente invención puede unirse a los pili de tipo IVb ya que el péptido tiene un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos capaz de unirse al sitio de unión de la proteína secretora de la pilina menor de los pili de tipo IVb. Por lo tanto, el péptido según la presente invención inhibe la unión de las proteínas secretoras y los pili de tipo IVb de las bacterias, uniéndose a los pili de tipo IVb y, en consecuencia,
- 45
- 50

puede inhibir que las bacterias se adhieran y colonicen la célula diana en los órganos digestivos y similares. Normalmente, los pili de tipo IVb forman un homotrímero, mientras que el péptido según la presente invención tiene un segundo dominio capaz de multimerizarse, por lo que el péptido puede unirse simultáneamente a todos los sitios de unión del homotrímero. Por lo tanto, es posible inhibir eficazmente la unión entre las proteínas secretoras de las bacterias y los pili de tipo IVb y, en consecuencia, es posible inhibir eficazmente que las bacterias se adhieran y colonicen la célula diana en órganos digestivos y similares. Este mecanismo de antiadherencia tiene muy poco efecto sobre el hospedador, ya que el péptido se une selectivamente a las bacterias patógenas en lugar de unirse a los receptores de las células hospedadoras y luego se provoca la eliminación fuera del hospedador. Además, a diferencia de los antibióticos, las bacterias patógenas no mueren, por lo que las presiones de selección son pequeñas y es posible suprimir la aparición de bacterias resistentes a los fármacos. Los inhibidores que se centran en ese mecanismo antiadherente se han estudiado para los pili de tipo I y los pili de tipo P transportados por *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) (Sharon, N. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1760, 527-537). Ambos son pili que tienen un dominio de lectina que reconoce una cadena de azúcar en la punta, y el desarrollo de derivados de azúcar y similares que se unen específicamente a la región de unión de la cadena de azúcar de los mismos está avanzando. En cuanto a ETEC, se ha estudiado un agente antiadherente en donde se une una cadena de azúcar a nanopartículas (Ravel, Y. S. et al. *Nanoscale* 2015, 7, 8326-8331). Sin embargo, dado que el mecanismo de adhesión a través de los pili no está claro, nunca se han desarrollado inhibidores que inhiban eficazmente la adhesión de los pili de tipo IVb.

Las SEQ ID NOS: 1 a 4 son secuencias implicadas en la unión a los sitios de unión de la pilina menor (CofB, LngB, CfcB y TcpB) correspondientes a proteínas secretoras tales como CofJ, LngJ, CfcJ y TcpF expresadas por bacterias que producen pili de tipo IVb. Por lo tanto, es posible inhibir la unión de la proteína secretora a los pili de tipo IVb, al incluir el primer dominio que tiene una alta homología con los mismos. Además, es particularmente preferible que el primer dominio consista en la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 4.

SEQ ID NO: 5 es una secuencia fuertemente implicada en la unión al sitio de unión de la pilina menor (CofB) en la secuencia de aminoácidos de CofJ. Por tanto, cuando el primer dominio tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5, el péptido según la presente invención puede inhibir eficazmente la unión entre CofJ y la pilina menor (CofB). Además, al configurar el primer dominio solo con la secuencia de SEQ ID NO: 5, el primer dominio se puede acortar y la estructura se puede simplificar.

SEQ ID NO: 23 es una secuencia en la que se añade serina al lado N-terminal de SEQ ID NO: 5 anterior y se añade lisina al lado C-terminal, y cuando el primer dominio tiene la secuencia de SEQ ID NO: 23, el péptido según la presente invención puede inhibir eficazmente la unión entre CofJ y la pilina menor (CofB) como en el caso de SEQ ID NO: 5 anterior. Además, al configurar el primer dominio solo con la secuencia de SEQ ID NO: 23, el primer dominio se puede acortar y la estructura se puede simplificar.

En el péptido según la presente invención, el segundo dominio contiene una secuencia de aminoácidos capaz de trimerización.

Dado que el pilus de tipo IVb forma un homotrímero como se ha descrito anteriormente, cuando el segundo dominio contiene una secuencia de aminoácidos capaz de trimerización, el péptido de la presente invención puede unirse a los sitios de unión en todas las pilinas menores del homotrímero. Esto puede inhibir eficazmente la unión entre las proteínas secretoras de las bacterias y los pili de tipo IVb.

En el péptido de la presente invención, el segundo dominio tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos que repite de 4 a 10 veces la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 6 es una secuencia que forma una hélice superenrollada trimérica de GCN4, y la secuencia de aminoácidos que repite de 4 a 10 veces la secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 es una secuencia que forma una estructura de triple hélice similar al colágeno, es decir, una secuencia que promueve la trimerización de péptidos. Por lo tanto, al proporcionar un segundo dominio que tiene esa secuencia de aminoácidos, el péptido de la presente invención puede formar un trímero. Por lo tanto, al adoptar esas secuencias, es posible obtener un péptido capaz de inhibir eficientemente la unión entre las proteínas secretoras bacterianas y los pili de tipo IVb como se ha descrito anteriormente.

Además, en el péptido según la presente invención, la secuencia enlazadora puede ser SEQ ID NO: 9.

El inhibidor de la colonización según la presente invención es aquel que inhibe la colonización de bacterias patógenas en órganos digestivos, caracterizado por contener el péptido según la presente invención.

Según el inhibidor de la colonización de acuerdo con la presente invención, es posible inhibir la unión entre los pili de tipo IVb y las células diana de los órganos digestivos ya que el inhibidor contiene el péptido según la presente invención. Como resultado, es posible inhibir la adhesión y la colonización de bacterias productoras de pili de tipo IVb en los órganos digestivos.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con el péptido de la presente invención y el inhibidor de la colonización que lo contiene, es posible inhibir la adhesión y la colonización de bacterias productoras de pili de tipo IVb en órganos digestivos.

Breve descripción de los dibujos

- Las FIGs. 1 (a) y (b) son diagramas modelo para explicar un mecanismo por el cual las bacterias patógenas que tienen pili de tipo IVb se adhieren y colonizan células que constituyen un órgano digestivo y similares.
- 5 Las FIGs. 2 (a) y (b) son diagramas modelo para explicar un mecanismo por el cual un péptido según una realización de la presente invención, inhibe la adhesión y la colonización.
- La FIG. 3 es un diagrama modelo que muestra una estructura tridimensional de CofA y CofB que son componentes constituyentes del pilus CFA/III.
- 10 La FIG. 4 (a) es una vista que muestra una configuración de un operón cof que es un grupo de genes que constituyen CFA/III, y la FIG. 4 (b) es una vista para explicar la formación de pili de tipo IV que consisten en CofA y CofB.
- La FIG. 5 (a) es una vista que muestra una estructura trimérica de CofB, y la FIG. 5 (b) es una vista que muestra una estructura trimérica de Discoidina I.
- Las FIGs. 6 (a) y (b) son vistas que muestran la unión entre CofJ y CofB.
- 15 La FIG. 7 es un diagrama modelo que muestra una estructura cristalina de un complejo en el que el péptido CofJ¹⁻²⁴ y CofB están unidos.
- La FIG. 8 es una vista que muestra genes homólogos en cada región codificante que codifica pili de tipo IVb, que muestra el operón cof, el operón lng, el operón tcp y el operón cfc.
- La FIG. 9 es una vista que muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones N-terminales de CofJ, LngJ, CfcJ y TcpF.
- 20 Las FIGs. 10 (a) a (c) son diagramas modelo que muestran los resultados del análisis de la estructura de CofB, y (a) muestra su estructura general, (b) muestra una vista ampliada del área incluida en un cuadrado en (a) y (c) es un diagrama que muestra el lado superior de (b).
- La FIG. 11 es una vista que muestra los resultados de un ensayo de precipitación ("pull-down assay") para examinar si el péptido inhibidor de CofJ¹⁻²⁴-GCN4 puede inhibir la unión entre CofB y CofJ.
- 25 La FIG. 12 es una vista que muestra los resultados de un ensayo de precipitación para examinar si el péptido CofJ¹⁻²⁴ y CofJpepR pueden inhibir la unión entre CofB y CofJ.
- La FIG. 13 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la actividad inhibidora de la adhesión de ETEC del péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4 utilizando células Caco2.
- 30 La FIG. 14 es una vista que muestra los resultados de un ensayo de precipitación para examinar si péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 puede inhibir la unión entre CofB y CofJ.
- La FIG. 15 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la actividad inhibidora de la adhesión de ETEC del péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 utilizando células Caco2.

Descripción de las realizaciones

A continuación se describirán realizaciones para llevar a cabo la presente invención.

- 35 El péptido de acuerdo con la realización de la presente invención es un péptido que puede unirse a los pili de tipo IVb de bacterias patógenas, evitando así que las bacterias patógenas se unan a receptores de las células diana a través de los pili. El péptido según esta realización comprende un primer dominio que se une a los pili de tipo IVb, un segundo dominio que es capaz de multimerizarse y una secuencia enlazadora que los conecta.
- 40 En la presente realización, las bacterias patógenas son bacterias patógenas en particular que tienen pili de tipo IVb, por ejemplo, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), cólera (*Vibrio cholerae*), *Citrobacter rodentium* y similares.
- En primer lugar, se ilustrarán esquemas de un mecanismo de adhesión y colonización de bacterias patógenas que tienen pili de tipo IVb, tales como ETEC, a células que constituyen un órgano digestivo y similares, y un mecanismo a través del cual el péptido según esta realización inhibe la adhesión y colonización de las mismas.
- 45 Como se muestra en la FIG. 1 (a), las ETECs mencionadas anteriormente y similares forman pili constituidos por una pilina mayor como subunidad constituyente principal y una pilina menor ligeramente incluida y situada en la punta de la pilina mayor, en la superficie de la misma. En particular, forman un multímero, por ejemplo, un homotrímero. ETEC y similares no pueden adherirse a las células diana en los órganos digestivos y similares solo por los pili que tienen esa configuración, y las proteínas secretoras expresadas por ETEC y similares son necesarias para la adhesión. En la pilina menor, está presente un sitio de unión de una proteína secretora y la proteína secretora se une a la pilina

menor, por lo que el pilus puede unirse a los receptores de las células diana a través de la proteína secretora como se muestra en la FIG. 1 (b). Como resultado, ETEC se adhiere a las células diana, luego se forman microcolonias y similares, con lo que es posible una colonización.

Como se ha descrito anteriormente, el péptido según la presente realización tiene un primer dominio que se une a los pili de tipo IVb, y como se muestra en la FIG. 2, el primer dominio del péptido se une a un sitio de unión de la proteína secretora en la pilina menor de los pili, como resultado, es posible inhibir la unión de la proteína secretora al sitio de unión. En particular, dado que el péptido según la presente realización tiene un segundo dominio que promueve la trimerización, el péptido forma un trímero y puede unirse a todos los sitios de unión de los pili del trímero, como se muestra en la FIG. 2 (b). De esta manera, es posible inhibir eficazmente la unión de las proteínas secretoras a los pili y, como resultado, es posible inhibir eficazmente la adhesión y colonización de bacterias patógenas tales como ETEC y similares a células diana.

Estos mecanismos se describirán con más detalle a continuación.

(Mecanismo de formación del pilus de tipo IVb)

Las bacterias que producen pili de tipo IVb tales como ETEC y similares, expresan factores de colonización, que son responsables de la formación del pilus. Como factor de colonización para formar pili de tipo IVb en las bacterias, se conoce CFA/III (CS8) y como otro factor de colonización que tiene una estructura génica y proteínas constituyentes que son muy similares al mismo, se conoce Longus (CS21).

Los pili de tipo IV se clasifican a groso modo en tipo IVa o IVb según la secuencia N-terminal y el tamaño general de la pilina mayor que es la principal subunidad constituyente, y CFA/III (CS8) y Longus (CS21) pertenecen al tipo IVb.

Estudios de análisis funcionales previos han revelado que el operón *cof*, que es un grupo de genes que constituye el CFA/III, está constituido por 14 tipos de grupos de genes, incluido el gen *cofA* que codifica la pilina mayor, el gen *cofB* que codifica la pilina menor y similares (Taniguchi, T. et al. Infect. Immun. 2001, 69, 5864-5873). Además, los presentes inventores determinaron la conformación estérica de *CofA* y revelaron la estructura de los pili formados por CFA/III (Fukakusa, S. et al. Acta Cryst. 2012, D68, 1418-1429) (FIG. 3). Además, tal y como se muestra en la FIG. 3, una determinación de la estructura tridimensional mediante un análisis de la estructura cristalina con rayos X y el análisis del estado asociado en solución mediante análisis de ultracentrifugación, han revelado que la pilina menor *CofB* que constituye los pili formados por CFA/III, forma una estructura homotrimérica fuerte en la que un dominio similar a la pilina en el lado N-terminal y dos dominios ricos en lámina β en la porción central y el lado C-terminal, están ligados helicoidalmente. Además, también se ha aclarado que la estructura del trímero está ubicada en la punta del pilus de tipo IVb que se compone principalmente de la pilina mayor *CofA* y desempeña un papel que favorece el inicio de la formación de los pili, como se muestra en las FIG. 4 (a) y 4 (b) (Kawahara, K. et al. J. Mol. Biol. 2016, 428, 1209-1226).

Las puntas de los pili de tipo IVb están unidas por un dominio rico en láminas β que existe en el lado C-terminal de la pilina menor *CofB*, y como resultado de la búsqueda de dominios análogos, se ha descubierto que ese dominio tiene una estructura plegada similar a la lectina de tipo H, como se muestra en la FIG. 5 (a). Como dominio de lectina de tipo H, se conocen la Discoidina I (FIG. 5 (b)) y la Discoidina II de *Dictyostelium discoideum* y la aglutinina de *Helix pomatia* (HPA), descubierta a partir de un caracol llamado caracol manzana, y en los últimos años se ha conocido *Sinularia lochmodes* (SLL2) de *Symbiodinium* sp. (Lescar, J. et al. Glycobiology 2007, 17, 1077-1083; Kita, A. et al. Glycobiology 2015, 25, 1016-1023), además de los pili CFA/III que posee ETEC, y todos ellos forman un homotrímero. En el límite molecular del trímero, hay tres sitios de unión a la cadena de azúcar conservados de manera equivalente. Se ha confirmado que la N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) se une en el sitio de unión en el caso de Discoidina I, Discoidina II, HPA y SLL2. Todos ellos están implicados en la adhesión y la autoagregación celular, al unirse a cadenas de azúcar. El reconocimiento de cadenas de azúcar a través de los dominios de lectina también se ha confirmado en los pili de tipo I.

(Mecanismo de adhesión y colonización de ETEC)

El mecanismo esquemático de adhesión y colonización de ETEC a la célula diana es como se ha descrito anteriormente con referencia a la FIG. 1, y el mecanismo de adhesión y colonización de ETEC de las células diana se ilustrará más detalladamente a continuación.

Dado que *CofB* tiene el dominio de lectina descrito anteriormente, se supone que el dominio produce la expresión de la capacidad de adhesión a las células diana, pero se ha descubierto a partir de los resultados del ensayo celular descrito en detalle en los ejemplos a continuación, que la cepa CFA/III de *E. coli* no ejerce la capacidad de adhesión sobre las células Caco2 únicamente a través de los pili de tipo IVb producidos en la superficie y que es esencial la expresión de la proteína secretora *CofJ* codificada igualmente por el operón *cof*. Este es un resultado que se aclaró por el hecho de que la cepa de ETEC carente de *CofJ* preparada por los presentes inventores, no muestra capacidad de adhesión a pesar de tener capacidad de formación de pili. A partir de este resultado, se piensa que *CofJ* interviene entre los pili y las células epiteliales intestinales, participando así en la adhesión al tracto intestinal y la posterior colonización.

Se ha aclarado a partir de los resultados del análisis de ultracentrifugación y similares, que *CofJ* interacciona con *CofB*, que es una subunidad ubicada solo en la punta del pilus, entre las subunidades constituyentes del pilus, como se

muestra en las FIGs. 6 (a) y 6 (b), y además, se ha mostrado a partir de los resultados del análisis de la estructura cristalina con rayos X y similares, que CofJ se une a uno de los tres sitios de unión equivalentes presentes en el trímero de CofB en el regiones N-terminales exentas de estructura secundaria (1 a 24).

En la actualidad, se han descrito varios subtipos en CofJ, y las vacunas que usan CofJ son difíciles de desarrollar ya que las mutaciones tienden a ocurrir en particular en la superficie del dominio globular de CofJ. También se ha referido que CofA, que es la principal subunidad constituyente de los pili, también sufre muchas mutaciones en la superficie de los pili (Njoroge, SM et al. FEMS Pathogens and Diseases 2015, 73, 1-4). Por otro lado, también se ha encontrado que los aminoácidos en el sitio de interacción entre CofJ y CofB estaban altamente conservados. Esto sugiere que la colonización con ETEC se puede inhibir mediante una inhibición de la interacción entre CofJ y CofB, y el péptido según la presente invención se encontró basándose en esta idea.

(Constitución del péptido)

Como se ha descrito anteriormente, el péptido según la presente realización comprende un primer dominio que se une específicamente a la pilina menor de los pili de tipo IVb, un segundo dominio capaz de multimerizarse y una secuencia enlazadora que los conecta.

Específicamente, el primer dominio contiene una secuencia de aminoácidos capaz de unirse al sitio de unión de la proteína secretora en la pilina menor del pilus. Es preferible que tenga, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos (SPSSSEGGGAFTVNMPKTSTVDDIR: SEQ ID NO: 1) en las regiones N-terminales (1 a 24^a) sin estructura secundaria en CofJ, capaz de unirse a CofB.

Además, en la estructura cristalina de un complejo en el que CofB y las regiones N-terminales sin estructura secundaria en CofJ (CofJ¹⁻²⁴) están unidos, CofB, tal y como se muestra en la FIG. 7, reconoce particularmente desde la quinta serina hasta la decimoquinta prolina del péptido CofJ¹⁻²⁴ y, entre las cuales, la décima fenilalanina atraviesa profundamente el bolsillo hidrofóbico de CofB. Por lo tanto, el primer dominio puede lograr la unión a CofB al contener al menos una secuencia de aminoácidos (SEGGGAFTVNMP: SEQ ID NO: 5).

Además, el segundo dominio contiene una secuencia que promueve la trimerización, de modo que puede unirse a todos los sitios de unión en la punta de los pili de tipo IV que muestran la estructura trimérica. Por ejemplo, a modo de péptido que permite la trimerización, se puede emplear un péptido modificado para permitir la trimerización de la cremallera de leucina de GCN4 (RMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLI: SEQ ID NO: 6) (Harbury et al. Nature 1994, 371, 80-83), un péptido modelo similar al colágeno compuesto por secuencias repetidas de (Pro-Pro-Gly)_n (SEQ ID NO: 7) o (Pro-Hyp-Gly)_n (SEQ ID NO: 8) en las que n = 4 a 10. En este caso, Hyp es 4 (R)-hidroxiprolina.

La secuencia enlazadora no está particularmente limitada siempre que actúe como un enlazador y, por ejemplo, se puede usar TSGGG (SEQ ID NO: 9) y similares.

En la descripción anterior, se han descrito los pili de tipo IVb formados principalmente por el factor de colonización CFA/III, sin embargo, los pili de tipo IVb formados por Longus expresado por ETEC, Tcp expresado por *Vibrio cholerae*, Cfc expresado por *C. rodentium* y similares, a modo de otros factores de colonización, se sabe que tienen grandes similitudes con los pili por el CFA/III (Mundy, R. et al. Mol. Microbiol. 2003, 48, 795-809). LngA (Longus), TcpA (Tcp) y CfcA (Cfc) se han identificado como los correspondientes a la pilina mayor CofA, y las regiones hidrofóbicas específicas de pilina en su lado N-terminal tienen una homología de secuencia alta del 70 al 75%. La Figura 8 muestra el operón lng que expresa LngA o similares, el operón tcp que expresa TcpA o similares y el operón cfc que expresa CfcA o similares, junto con el operón cof que expresa CofA o similares. Como se muestra en la FIG. 8, no solo están presentes CofA, LngA, TcpA y CfcA, sino también muchos genes homólogos.

Además, LngB (Longus), TcpB (Tcp) y CfcB (Cfc) correspondientes a la pilina menor CofB también tienen similitudes entre sí. Además de ellos, las secuencias N-terminales de LngJ (Longus), TcpF (Tcp) y CfcJ (Cfc) correspondientes a la proteína secretora CofJ, también tienen similitudes. La FIG. 9 muestra las secuencias de aminoácidos de sus regiones N-terminales. En la FIG. 9, la flecha muestra la décima fenilalanina de CofJ implicada fuertemente en la unión a CofB descrita anteriormente, y el subrayado muestra una porción de secuencia que no formaría una estructura secundaria. La porción subrayada corresponde a las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 4 relacionadas con el péptido de la presente realización, y esa secuencia es una secuencia de una porción que no forma una estructura secundaria como se ha descrito anteriormente, es decir, es una secuencia favorable para la unión a la pilina menor.

Aunque no forma parte de la invención reivindicada, se describe además que el péptido de la presente realización puede modificarse para evitar la descomposición del péptido y similares.

El método para preparar el péptido de acuerdo con la presente realización no está particularmente limitado, y se puede usar un método que generalmente se usa para la síntesis de péptidos y, por ejemplo, se puede usar un método de ingeniería genética o un método químico que emplea la síntesis orgánica, más específicamente, se pueden usar los métodos mostrados en los siguientes ejemplos.

Otra realización de la presente invención es un inhibidor de la colonización que comprende el péptido descrito anteriormente de la presente invención, para inhibir la adhesión y la colonización de bacterias que producen pili de

tipo IVb a células diana en órganos digestivos y similares. El inhibidor de la colonización según esta realización puede contener aditivos tales como un estabilizador, un tampón, un diluyente, un excipiente y similares, además del péptido mencionado anteriormente. Además, el inhibidor de la colonización según esta realización está preferiblemente en una forma de dosificación capaz de administración oral y es preferiblemente, por ejemplo, un comprimido, una cápsula, una píldora o similar, pero no se limita a los mismos. Además, el inhibidor de la colonización de acuerdo con la presente realización, puede someterse a tratamientos de recubrimiento tales como recubrimiento entérico usando ftalato acetato de celulosa (CAP), ftalato de hipromelosa (HPMCP), polímero de tipo ácido acrílico y similares, recubrimiento de liberación sostenida usando etilcelulosa y similares, pero el tratamiento no se limita los mismos.

Ejemplos

- 10 El efecto del péptido según la presente invención sobre la capacidad de colonización a través de los pili CFA/III de ETEC se explicará a continuación como ejemplos típicos de la presente invención.

(Ejemplo 1) Experimento de adhesión de la cepa productora de *Escherichia coli* CFA/III a células Caco2

- A partir de los informes que hay hasta el momento, no solo de la cepa ETEC 31-10 de tipo silvestre que produce CFA/III (cepa ETEC 1373) cultivada con agar de CFA, sino también de la cepa (HB101 cof) obtenida al introducir el plásmido pTT240 que contiene el operón cof en la cepa de *E. coli* HB101 (Nippon Gene), se ha descrito que tienen la capacidad de formar pili de tipo IVb como el tipo silvestre, en las mismas condiciones de cultivo y se adhieren a las células Caco2 (Honda, T. et al. Infect. Immun. 1989, 57, 3452-3457; Taniguchi, T. et al. Infect. Immun. 2001, 69, 5864-5873). En este caso, el plásmido pTT240 que contiene el operón cof se preparó mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, como resultado de un análisis de la secuencia de bases del grupo de genes cof, la presencia del sitio de corte de la enzima de restricción KpnI aguas arriba de la secuencia promotora del gen cof y el sitio de corte de la enzima de restricción *Stu*I aguas abajo del gen cofJ que es el último gen del grupo de genes cof, se mostraron claramente, por lo tanto, el plásmido pSH1134 que contenía el grupo de genes cof se escindió con la enzima de restricción *Stu*I, luego, el enlazador KpnI fosforilado (Takara Shuzo) se ligó y se escindió con la enzima de restricción KpnI. El fragmento de 13,8 kb resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, se purificó y luego se ligó al plásmido pMW 119 (Nippon Gene) tratado con la enzima de restricción KpnI. El plásmido obtenido se denominó pTT240. Además, las células Caco2 se consideran células modelo para la colonización con ETEC de células epiteliales del intestino delgado (Darfeuille-Michaud, A. et al. Infect. Immun. 1990, 58, 893-902). Por lo tanto, los experimentos de adhesión se realizaron usando células HB 101 cof y Caco2 como sigue.

- En primer lugar, las células Caco2 se dispersaron utilizando medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 50 µg/mL de gentamicina y 10% de suero bovino fetal, la concentración de células se midió utilizando una cámara de recuento de células sanguíneas y se diluyó hasta $3,0 \times 10^5$ células/mL. Se añadió líquido de dilución a una placa de 6 pocillos, añadiendo a cada uno una cantidad de 500 µL, y se realizó el cultivo dejando que la placa permaneciera inmóvil en una incubadora de CO₂, con CO₂ al 5% y 37°C durante 48 horas. Las células Caco2 cultivadas se lavaron dos veces con PBS. Después del lavado, se filtró el DMEM que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 1% de D-manosa pasándolo a través de un filtro de 0,22 µm, luego se añadieron 500 µL de la solución a cada pocillo.

- A continuación, se raspó una pequeña cantidad de la reserva en glicerol de HB101 cof y se añadió a medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina, y se llevó a cabo un cultivo con agitación durante la noche a 25°C. El líquido del cultivo se diluyó adecuadamente y se calculó la DO₆₆₀ del líquido de cultivo usando un turbidímetro. El líquido del cultivo se diluyó en serie y se midió la UFC (unidad formadora de colonias). A partir de la UFC medida, se calculó la concentración (células/mL) de HB101 cof con DO₆₆₀ = 1,0. Este valor calculado se utilizó para determinar la concentración de HB101 cof posteriormente.

- Además del cultivo anterior, se raspó una pequeña cantidad de la reserva en glicerol de HB101 cof y se añadió a medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina, y se llevó a cabo un cultivo con agitación durante la noche a 25°C. El líquido del cultivo bacteriano se diluyó 10 veces con medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina y se transfirió una cantidad de 500 µL a una placa de agar de CFA (1% de casaminoácidos, 0,15% de extracto de levadura, 0,005% de MgSO₄, 0,0005% de MnCl₂, 2% de agarosa) y el cultivo se realizó dejando la placa en reposo a 37°C durante 24 horas. Se añadieron 3 mL de PBS al medio de agar después del cultivo, y la suspensión se suspendió con una varilla para diseminar y luego se recuperó. El líquido del cultivo recuperado se diluyó 100 veces y se midió la DO₆₆₀. La DO₆₆₀ del líquido del cultivo antes de la dilución se calculó a partir de la DO₆₆₀ medida y la concentración de *E. coli* (células/mL) se calculó en función de la concentración (células/mL) de HB101 cof con DO₆₆₀ = 1,0 descrita anteriormente. HB101 cof se diluyó con PBS hasta $1,0 \times 10^9$ células/mL para preparar una muestra para el ensayo de colonización.

- La muestra preparada se añadió en una cantidad de 50 µL a las células Caco2 en la placa de 6 pocillos y la placa se dejó reposar en una incubadora de CO₂ con CO₂ al 5% y 37°C durante 3 horas. Tres horas más tarde, tras tres lavados con PBS, se añadieron 500 µL de PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% y tras 5 minutos de reposo se recuperó. La solución recuperada se diluyó en serie y se midieron las UFC. A partir de las UFC medidas, se calculó el número de bacterias colonizadas en las células Caco2. La tasa de recuperación (%) se calculó dividiendo el número de bacterias que habían sido colonizadas por el número de bacterias añadidas a las células Caco2 ($5,0 \times 10^7$ células) y multiplicando por 100. Como resultado, era del 16,9% y se confirmó la capacidad de adhesión en ese sistema experimental.

(Ejemplo 2) Experimento de adhesión de cepas carentes de CofB y cepas carentes de CofJ a células Caco2

En el Ejemplo 1 anterior, se confirmó que HB101 cof podía adherirse a las células Caco2, por lo tanto, se preparó entonces la cepa carente de CofB y la cepa carente de CofJ, y se examinaron las funciones de CofB y CofJ. El método se describirá a continuación.

Primero, se preparó una cepa carente del gen *cofJ* (HB101-cof-Δ*cofJ*) basada en el plásmido pTT240. Prestando atención a la presencia del sitio de escisión de la enzima de restricción NcoI en dos lugares de la región ORF del gen *cofJ*, la cepa se escindió incubando a 37°C durante 1 hora con NcoI, seguida de purificación. El plásmido obtenido ligando el producto de escisión purificado, se denominó plásmido pcof-Δ*cofJ* carente de CofJ. Una cepa obtenida mediante la transformación de la cepa HB101 de *Escherichia coli* con pcof-Δ*cofJ*, se denominó cepa HB101-cof-Δ*cofJ* carente de CofJ.

Para complementar el gen *cofJ* con la cepa carente de *cofJ* en configuración trans, se decidió incorporar el gen *cofJ* en el vector plasmídico pACYC184. Prestando atención a la presencia de los sitios de enzimas de restricción de Sall aguas arriba y HindIII aguas abajo del gen *cofJ* en el plásmido pTT240, después del tratamiento con enzimas de restricción, el extremo del producto de escisión se hizo romo y el producto se purificó. El plásmido obtenido ligando el producto de escisión purificado con el vector plasmídico tratado con EcoRV, pACYC184 (NIPPON GENE) se denominó plásmido pcofJ complementado con *cofJ*. Una cepa obtenida transformando la cepa HB101 de *Escherichia coli* con pcof-Δ*cofJ* y pcofJ se denominó cepa HB101-cof-Δ*cofJ* + pcofJ complementada con CofJ.

La cepa HB101-cof-Δ*cofB* carente de CofB y la cepa HB101-cof-Δ*cofB* + pcofB complementada con CofB se prepararon de acuerdo con la bibliografía citada (Kawahara, K, et al. J. Mol. Biol, 2016, 428, 1209-1226). Los experimentos de adhesión de la cepa HB101-cof-Δ*cofJ* carente de CofJ, la cepa HB101-cof-Δ*cofJ* + pcofJ complementada con CofJ, la cepa HB101-cof-Δ*cofB* carente de CofB y la cepa HB101-cof-Δ*cofB* + pcofB complementada con CofB, se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Como resultado del experimento, la tasa de recuperación era del 0,30% para la cepa HB101-cof-Δ*cofJ* carente de CofJ, 2,9% para la cepa HB101-cof-Δ*cofJ* + pcofJ complementada con CofJ, 0,79% para la cepa HB101-cof-Δ*cofB* carente de CofB y 2,9% para la cepa HB101-cof-Δ*cofB* + pcofB complementada con CofB.

Es decir, la cepa HB101-cof-Δ*cofJ* carente de CofJ se adhería a las células Caco2 solo 0,018 veces y la cepa HB101-cof-Δ*cofB* carente de CofB se adhería solo 0,047 veces, en comparación con HB101 cof. Además, aunque la cepa HB101-cof-Δ*cofJ* + pcofJ complementada con CofJ y la cepa HB101-cof-Δ*cofB* + pcofB complementada con CofB no tenían tanta una capacidad de colonización como HB101 cof, se observó una recuperación de la capacidad de colonización en comparación con cada cepa con carencia. Por lo tanto, se reconoce que CofB y CofJ están implicados en la adhesión a células Caco2 a través de HB101 cof.

(Ejemplo 3) Análisis de la interacción entre CofJ y una subunidad del pilus

A continuación, se analizó la interacción entre una proteína secretora CofJ y las subunidades CofA y CofB constituyentes del pilus.

Para analizar la interacción entre CofJ y las subunidades constituyentes del pilus CofA y CofB, se diseñaron estructuras artificiales (ΔN28-CofA, ΔN28-CofB) que excluyen la región hidrófoba (1 a 28 residuos) en el extremo N- terminal de CofA y CofB para mejorar la solubilidad, y se llevaron a cabo la expresión y la purificación de las mismas. Los métodos de expresión y purificación se llevaron a cabo de acuerdo con publicaciones científicas anteriores (Fukakusa, S, et al. Acta Cryst. 2012, D68, 1418-1429; Kawahara, K, et al. J. Mol. Biol, 2016, 428, 1209-1226).

La expresión y la purificación de CofJ se realizaron mediante el siguiente procedimiento. La amplificación mediante PCR se realizó a partir del plásmido pTT240 usando el cebador directo: 5'-GCGCCCGGGTCGCCATCCTCTCAGAAGG-3' (SEQ ID NO: 10) y el cebador inverso: 5'-CAAGAATTCTTATTAATCAAGGCCACAAGCCTTC-3' (SEQ ID NO: 11). Después del tratamiento con las enzimas de restricción SmaI y EcoRI, se utilizó un plásmido ligado al vector pET48b (Merck Biosciences) tratado de la misma manera que el plásmido de expresión CofJ. Una cepa obtenida transformando la cepa de *E. coli* Shuffle T7 Express lysY Competent *E. coli* (New England Biolabs) utilizando el plásmido de expresión CofJ, se cultivó con agitación a 37°C con medio LB que contenía 35 μg/mL de kanamicina como precultivo. Todo el líquido del precultivo se añadió al líquido de cultivo principal y se cultivó a 37°C hasta que la DO₆₀₀ llegó a 0,60. La inducción de la expresión se llevó a cabo mediante la adición de IPTG 0,2 mM y el cultivo en agitación se llevó a cabo a 20°C durante 18 horas. El cuerpo microbiano se recuperó por centrifugación a 4000 G y 4°C durante 7 min y se suspendió en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 8,0) sobre hielo y lisozima con una concentración final de 0,2 mg/mL y Triton-X 100 con una concentración final de 0,2% y se dejó reposar la mezcla durante 15 minutos. El cuerpo microbiano se rompió con ultrasonidos (10 segundos, 50 segundos de descanso, 15 ciclos), y el material sobrenadante que contenía la proteína soluble se recuperó por centrifugación a 24000 G y 4°C durante 1 hora. El material sobrenadante resultante se añadió a una columna quelante HiTrap (GE Healthcare Biosciences) que unía Ni²⁺ y se equilibró con el tampón de lisis anterior. Después de lavar con el tampón de lisis descrito anteriormente que contenía imidazol 15 mM añadido, se eluyó CofJ con el marcador His mediante un gradiente de imidazol de 15 a 500 mM. Se añadieron 30 unidades de proteasa Turbo 3C (Accelagen) a la fracción eluida y el marcador de la fusión se escindió a 10°C mientras se dializaba

frente a Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0, imidazol 15 mM. Se permitió que CofJ cortado con el marcador de fusión pasara a través de una columna de Ni equilibrada, para provocar la separación del marcador. El CofJ separado se sometió a una purificación final utilizando una columna de filtración en gel Superdex 75 (GE Healthcare Biosciences) equilibrada con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0.

La expresión de $\Delta N24$ -CofJ que no tenía 24 residuos en el lado N-terminal de CofJ, se llevó a cabo como sigue. Después de una amplificación mediante PCR inversa usando el cebador directo: 5'-GGTTGCCCAACTTTGGAAAC-3' (SEQ ID NO: 12) y el cebador inverso: 5'-ACCCAGACCCGGTCCCTGAAAGAG-3' (SEQ ID NO: 13) basado en el vector para la expresión de CofJ, con extremos romos por la enzima de restricción SmaI, a continuación se realizó la ligación para obtener un plásmido denominado plásmido de expresión CofJ $\Delta 24$. La expresión y purificación de CofJ $\Delta 24$ se realizaron de la misma manera que para CofJ.

El análisis de la interacción se realizó usando CofB, CofJ y $\Delta N24$ -CofJ preparados por los métodos anteriores. Se utilizó un calorímetro de titulación isotérmica Microcal iTC 200 (fabricado por GE Healthcare) para el análisis de la interacción entre la proteína secretora CofJ y $\Delta N28$ -CofB. Se cargó una solución de CofJ 0,59 mM en una jeringa de titulación y una solución de $\Delta N28$ -CofB 28,5 μ M (en términos de trímero) en una celda de medición, respectivamente, y se evaluó la interacción de ambos mediante la observación directa de los cambios térmicos que ocurrían al gotear la solución de CofJ en la solución de $\Delta N28$ -CofB. Las condiciones de la titulación eran tales que la cantidad de goteo inicial era de 1 μ L, la cantidad de goteo siguiente y en los tiempos subsiguientes era de 2 μ L, y el goteo se realizó 20 veces en total cada 120 segundos. La temperatura de medición era de 25°C y el disolvente era Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM. Se observó un cambio exotérmico al gotear la solución de CofJ, que convergía hasta el mismo nivel que el calor de dilución a medida que avanzaba la titulación. Como resultado del análisis de los datos obtenidos utilizando un programa informático de análisis Origin (Microcal), se observó la unión de CofJ y $\Delta N28$ -CofB. El valor de la constante de disociación Kd de ambos era 0,2 μ M.

De manera similar, se utilizó un calorímetro de titulación isotérmica Microcal iTC 200 (fabricado por GE Healthcare) para el análisis de la interacción entre CofJ y $\Delta N28$ -CofA. Se cargó una solución de CofJ 0,59 mM en una jeringa de titulación y una solución de $\Delta N28$ -CofA 28,5 μ M (en términos de trímero) en una celda de medición, respectivamente, y se evaluó la interacción de ambos mediante la observación directa de los cambios térmicos que ocurrían al gotear la solución de CofJ en la solución de $\Delta N28$ -CofA. Las condiciones de titulación y las condiciones del disolvente eran las mismas que en el análisis de la interacción entre la proteína secretora CofJ y $\Delta N28$ -CofB. No se observó ningún cambio en el valor calórico debido al goteo de la solución de CofJ. A partir de ello, se mostraba que CofJ y $\Delta N28$ -CofA no se unían.

A continuación, para investigar la contribución a la unión a los pili en la región N-terminal (1 a 24) de la proteína secretora CofJ, se llevó a cabo un análisis de la interacción entre $\Delta N24$ -CofJ y $\Delta N28$ -CofB utilizando un calorímetro de titulación isotérmica Microcal iTC 200 (fabricado por GE Healthcare). Se cargó una solución de $\Delta N24$ -CofJ 0,59 mM en una jeringa de titulación y una solución de $\Delta N28$ -CofB 28,5 μ M (en términos de trímero) en una celda de medición, respectivamente, y se evaluó la interacción de ellos observando directamente los cambios térmicos que ocurrían al gotear la solución de $\Delta N24$ -CofJ en la solución de $\Delta N28$ -CofB. No se observó ningún cambio en el valor calórico debido al goteo de la solución de $\Delta N24$ -CofJ. A partir de ello, se mostraba que $\Delta N24$ -CofJ y $\Delta N28$ -CofB no se unían.

Además, para investigar la contribución a la unión a los pili en la región N-terminal (1 a 24) de la proteína secretora CofJ, se llevó a cabo un análisis de la interacción entre un péptido sintético que consistía en 24 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de CofJ (péptido CofJ¹⁻²⁴) adquirido en Scrum Co., Ltd. y $\Delta N28$ -CofB, usando un calorímetro de titulación isotérmica Microcal iTC200 (fabricado por GE Healthcare) de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Una solución del péptido CofJ¹⁻²⁴ 2 mM se cargó en una jeringa de titulación y una solución de $\Delta N28$ -CofB de 33,9 μ M (en términos de trímero) se cargó en una celda de medición, respectivamente, y la interacción de ellos se evaluó observando directamente los cambios térmicos que ocurrían al gotear la solución de péptido CofJ¹⁻²⁴ en la solución de $\Delta N28$ -CofB. Se observó un cambio exotérmico al gotear la solución del péptido CofJ¹⁻²⁴, que convergía al mismo nivel que el calor de dilución a medida que avanzaba la titulación. Como resultado del análisis de los datos obtenidos mediante un programa informático de análisis Origin, se observaba la unión del péptido CofJ¹⁻²⁴ y $\Delta N28$ -CofB. El valor de la constante de disociación Kd de ambos era 4 μ M.

A continuación, para investigar la especificidad de la unión del péptido CofJ¹⁻²⁴, el análisis de la interacción entre un péptido aleatorio sintético (CofJpepR) adquirido en Scrum Co., Ltd. y $\Delta N28$ -CofB se llevó a cabo usando un calorímetro de titulación isotérmica Microcal iTC 200 (fabricado por GE Healthcare). Se cargó una solución de péptido aleatorio 2 mM en una jeringa de titulación y una solución de $\Delta N28$ -CofB 28,5 μ M (en términos de trímero) en una celda de medición, respectivamente, y se evaluó la interacción entre ellos mediante la observación directa de los cambios térmicos que ocurrían al gotear la solución de $\Delta N24$ -CofJ en la solución de $\Delta N28$ -CofB. No se observó ningún cambio en el valor calórico debido al goteo de la solución de péptido aleatorio. A partir de ello, se mostraba que el péptido aleatorio y $\Delta N28$ -CofB no se unían.

A partir de lo anterior, se sugiere que CofA y CofJ no se unen, pero CofB y CofJ se unen entre sí, y en particular están involucrados de 1 a 24 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de CofJ.

(Ejemplo 4) Determinación de la tasa de asociación de CofJ con $\Delta N28$ -CofB mediante análisis con ultracentrifugación

A continuación, se examinó la tasa de asociación de CofJ con Δ N28-CofB. Para la determinación de su tasa de asociación se utilizó una ultracentrífuga analítica Optima XL-I (fabricada por Beckman Coulter). Se seleccionó cuarzo para la ventana de la celda de medición, y se usó como pieza central una pieza central de 6 orificios a base de Charcoal Epon que tenía una longitud de celda de 1,2 cm. La temperatura de medición era de 20°C y el disolvente era Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM. La velocidad de rotación del rotor se fijó en 5000, 8000, 10000 rpm, y el gradiente de concentración en la celda se controló mediante un detector de UV cada 2 horas, después de alcanzar la velocidad de rotación establecida en cada grupo de rotación. En el momento en que el valor rmsd de la absorbancia observada para cada examen se convertía en 0,01 o menos, se establecía el equilibrio de sedimentación y, después de confirmar el equilibrio, se evaluaba el gradiente de concentración con un equilibrio de sedimentación a 297 nm. El número de integraciones se fijó en 4 veces. Se confirmó que una molécula de CofJ y una molécula de trímero Δ N28-CofB estaban asociadas, a partir del gradiente de concentración obtenido, tal y como se ha descrito anteriormente y el peso molecular aparente calculado en base a ello.

(Ejemplo 5) Determinación de la estructura del complejo del péptido CofJ¹⁻²⁴ y CofB

A continuación, para determinar la estructura del complejo formado por el péptido CofJ¹⁻²⁴ y CofB descritos anteriormente, se intentó la preparación de cristales del complejo.

Para ello, en primer lugar, el péptido CofJ¹⁻²⁴ obtenido mediante síntesis de péptidos, se mezcló con Δ N28-CofB para duplicar la proporción de la cantidad de sustancia, para obtener una muestra cristalizada. La selección inicial se llevó a cabo a 20°C mediante un método de difusión de vapor en gota apoyada utilizando un kit de selección Wizard Screen I, II (Emerald Biosystems). Cada gota, 1 μ L del péptido mixto descrito anteriormente (péptido Δ N28-CofB/CofJ¹⁻²⁴), preparada para que la concentración de CofB fuera de 10, 5, 2,5 mg/mL y 1 μ L de la solución de cristalización, se mezclaron y se dejaron reposar. Como resultado de la selección, se obtuvieron cristales iniciales en las condiciones de Wizard 11-39 (CAPS 100 mM, pH 10,5, PEG 8000 al 20 %, NaCl 200 mM). Después de optimizar las condiciones, se formó una gota de 3 a 4 μ L mezclando cantidades iguales de péptido Δ N28-CofB/CofJ¹⁻²⁴ que tenía una concentración de 5 mg/mL y una solución de cristalización usando 40 μ L de la solución de cristalización como reservorio, y se dejó reposar a 20°C durante 3 días, por lo que se pudieron obtener cristales aciculares.

Para los cristales complejos resultantes del péptido Δ N28-CofB/CofJ¹⁻²⁴, las mediciones de difracción se llevaron a cabo en las instalaciones grandes de radiación de sincrotrón SPring-8 BL26B1. Después de recuperar el cristal complejo a partir de la gota con un bucle de nailon, se realizó una congelación rápida en una corriente de nitrógeno de -173°C y se recuperaron los datos de la difracción. Las imágenes de la difracción de los cristales complejos mostraban una capacidad de difracción con la resolución más alta de 3,85 Å. La integración de intensidades y el procesamiento a escala se realizaron utilizando el programa HKL2000. Los cristales complejos pertenecían al grupo espacial P65 y las constantes de red eran $a = 157,76$ Å, $b = 157,76$ Å, $c = 118,53$ Å, $\alpha = \beta = 90,0^\circ$ y $\gamma = 120,0^\circ$. La determinación de la fase inicial se realizó por un método de reemplazo molecular utilizando un programa Phaser. Los datos de las coordenadas de Δ N28-CofB (PDBID: 5AX6) se utilizaron como datos de coordenadas del modelo de búsqueda inicial al aplicar el reemplazo molecular, y considerando la existencia de un enlazador entre el dominio 1 y el dominio 2 con alta movilidad, éstos se descompusieron en dos fragmentos: se adoptó como modelo de búsqueda inicial un fragmento del dominio 1 y otro fragmento (fragmento trímero compuesto por los dominios 2 a 3), y se obtuvo la solución de la fase inicial por reemplazo molecular. Como resultado, se encontró una solución que contenía tres fragmentos monómeros del dominio 1 y un fragmento trímero compuesto por los dominios 2 y 3 adoptados como modelo de búsqueda inicial. Los fragmentos resultantes del método de reemplazo molecular se conectaron con un programa de soporte de diseño molecular Coot, a continuación el refinamiento de la estructura inicial se realizó con un programa de refinamiento de estructura PHENIX, como resultado la densidad electrónica del péptido CofJ¹⁻²⁴ se observó en tres lugares en el límite molecular del dominio de lectina de tipo H de un trímero Δ N28-CofB, como se muestra en la FIG. 10.

A partir de esos resultados, se sugirió que tres péptidos CofJ pueden unirse en el dominio de lectina de tipo H de un trímero CofB.

(Ejemplo 6) Diseño del péptido inhibidor de tipo fusión con GCN4

A continuación, para preparar un péptido trímero capaz de unirse al dominio de lectina de tipo H de cada uno de los trímeros CofB mencionados anteriormente, se usó GCN4 que tenía un dominio de trimerización y se intentó crear un péptido en el que GCN4 y un péptido CofJ se unen a través de un enlazador.

Por tanto, en primer lugar, el plásmido de expresión de un péptido inhibidor (denominado CofJ¹⁻²⁴-GCN4) en el que el péptido CofJ¹⁻²⁴ y GCN4 se fusionaron usando un enlazador (TSGGG), se construyó de la siguiente manera. Los ácidos oligonucleicos se conectaron mediante una reacción PCR, para sintetizar el gen CofJ¹⁻²⁴-GCN4. CjN-T-1, 6 (Tabla 1) se prepararon para tener una concentración final de 0,6 μ M y CjN-T-2, 3, 4, 5 (Tabla 1) se prepararon para tener una concentración final de 0,03 μ M, y se realizaron 20 ciclos de PCR. El producto amplificado resultante se escindió con las enzimas de restricción NdeI/XhoI, se purificó y se ligó a un vector pET30a (MERCK Biosciences) tratado de la misma manera para obtener un plásmido. Sin embargo, ya que CofJ¹⁻²⁴-GCN4 no se expresaba en ese plásmido, se decidió expresarlo mediante un vector al que se añadió un marcador GST en el extremo N-terminal. La PCR se realizó durante 35 ciclos utilizando CjN-T-7,8 como cebador y el plásmido descrito anteriormente como molde. El producto amplificado resultante se escindió con las enzimas de restricción BamHI/XhoI, se purificó y se ligó a un

vector pGEX6P-1 (GE Healthcare Biosciences) tratado de la misma manera para obtener un plásmido de expresión CofJ¹⁻²⁴-GCN4.

[Tabla 1]

Cebador	Secuencia de bases del cebador
CJN-T-1 (SEQ ID NO: 14)	5'-GTTCCACATATGAGCCCGTCTTCCAGCGAAGGTGGTGCTTTCACCGTTAAC-3'
CJN-T-2 (SEQ ID NO: 15)	5'- GACCTCTACTGTTGACGATATCCGTAAGTGGTGGCGGTCGTATGAAACAGATC- 3'
CJN-T-3 (SEQ ID NO: 16)	5'-GATCGAGGAAATCCTGTCCAAGATCTACCACATCGAAAACGAGATCGCGC-3'
CJN-T-4 (SEQ ID NO: 17)	5'-GGATATCGTCAACAGTAGAGGTCTTCGGCATGTAAACGGTGAAAGCACCACC - 3'
CJN-T-5 (SEQ ID NO: 18)	5'-CTTGGACAGGATTTCTCGATCTTGTCTTCGATCTGTTTCATACGACCGCC-3'
CJN-T-6 (SEQ ID NO: 19)	5'-CTAGCTCTCGAGTTAGATAAGCTTCTTGATACGCGCGATCTCGTTTTCGATG-3'
CJN-T-7 (SEQ ID NO: 20)	5'-GTTCCAGGATCCCGTCTTCCAGCGAAGGTG-3'
CJN-T-8 (SEQ ID NO: 21)	5'-GGTGCTCGAGTTAGATAAGCTTCTTG-3'

5 A continuación, se transformó una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NIPPON GENE) usando un plásmido para expresar CofJ¹⁻²⁴-GCN4. Las colonias se recogieron, se añadieron a medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina y se cultivaron con agitación durante la noche a 37°C. A la mañana siguiente, se añadió todo el líquido del cultivo al medio de cultivo principal y se amplió a escala y cultivó con agitación a 37°C. Al llegar a una DO₆₀₀ = 0,6, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se agitó a 25°C durante 18 horas para inducir la expresión. El cuerpo microbiano inducido por la expresión se recuperó mediante centrifugación a 4000 G y 4°C durante 7 minutos. El cuerpo microbiano resultante se disolvió con un tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,0) sobre hielo, luego se añadió lisozima a 20 µg/mL y Triton X-100 al 0,2% y la muestra se dejó reposar durante 15 minutos, luego se repitió 15 veces el ciclo de ruptura ultrasónica durante 15 segundos y descanso durante 1 minuto. La solución ultrasónica destruida se centrifugó a 20000 G y 4°C durante 1 hora, y el material sobrenadante de la centrifugación se filtró a través de un filtro de 0,8 µm. La muestra filtrada se aplicó a una columna GST (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow: GE Healthcare Biosciences) equilibrada con un tampón de lisis. La columna GST se lavó con un tampón de lisis, luego se eluyó con un tampón de elución (Tris-HCl 20 mM, GSH 20 mM, pH 8,0). La muestra eluida se dializó con un tampón de diálisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) mientras se trataba enzimáticamente con 30 unidades de proteasa Turbo 3C Protease (Accelagen), para escindir el marcador GST y CofJ¹⁻²⁴-GCN4. La muestra después de la escisión se aplicó a la columna GST, para separar el marcador GST y CofJ¹⁻²⁴-GCN4. La muestra recuperada se aplicó a una columna Hitrap DEAE (GE Healthcare Biosciences) equilibrada con un tampón de diálisis y la elución se realizó aplicando un gradiente de concentración de NaCl de 0 a 2 M. La muestra resultante se aplicó a una columna Superdex 75 (26 /60) (GE Healthcare Biosciences) equilibrada con un tampón de filtración en gel (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0), para obtener un producto final purificado.

25 El producto final purificado resultante está constituido por 4 residuos de la secuencia derivada del vector (GPLG), 24 residuos derivados de la región N-terminal de CofJ (secuencia de CofJ¹⁻²⁴) (SPSSSEGAFTVNM PKTSTVDDIR: SEQ ID NO: 1), 5 residuos de una secuencia de enlazador (TSGGG: SEQ ID NO: 9) y 30 residuos de una secuencia de GCN4 (RMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLI) (SEQ ID NO: 6), de la secuencia del lado N-terminal. Este se denominó péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4.

30 (Ejemplo 7) Análisis de la interacción entre el péptido inhibidor de tipo fusión con GCN4 y ΔN28-CofB mediante ITC

Para investigar la contribución a la unión a los pili del péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4 obtenido en el Ejemplo 6, se llevó a cabo un análisis de la interacción entre el péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4 y ΔN28-CofB usando un calorímetro de titulación isotérmica Microcal iTC200 (fabricado por GE Healthcare). Una solución de péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4 0,59 mM se cargó en una jeringa de titulación y se cargó una solución de ΔN28-CofB 28,5 µM (en términos de trimero) en una celda de medición, respectivamente, y se evaluó la interacción de ambos mediante la observación directa de los cambios térmicos que ocurrían al gotear la solución de péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4 en la solución de ΔN28-CofB. Se observó un cambio exotérmico al gotear la solución de péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4, que convergía al mismo nivel que el calor de dilución a medida que avanzaba la titulación. Como resultado del análisis de los datos obtenidos mediante un programa informático de análisis Origin, se observaba la unión del péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4 y ΔN28-CofB. El valor de la constante de disociación K_d de ambos era 0,04 µM.

Como resultado del análisis, se mostraba que la afinidad de la unión entre el péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4 y ΔN28-

CofB era aproximadamente 5 veces más fuerte que en comparación con la afinidad de la unión entre CofJ y Δ N28-CofB y se aclaró que el péptido inhibidor del tipo fusión con GCN4 inhibe eficazmente la interacción entre CofJ y Δ N28-CofB.

(Ejemplo 8) Inhibición de la interacción entre CofB/CofJ a través de un péptido inhibidor mediante un ensayo de precipitación

- 5 Para examinar si el péptido inhibidor CofJ¹⁻²⁴-GCN4 es capaz de inhibir la unión de CofB y CofJ, se confirmó en el sistema de experimentos *in vitro* mediante un ensayo de precipitación utilizando una columna de Ni. Para los experimentos, se empleó el péptido Δ N28-CofB(Trx-His- Δ N28-CofB), CofJ, CofJ¹⁻²⁴-GCN4, CofJ¹⁻²⁴ y un péptido (CofJpepR) en el que la secuencia de aminoácidos del péptido CofJ¹⁻²⁴ se había aleatorizado, con marcador de tiorredoxina añadido (Trx) y marcador His. La secuencia de CofJpepR es NPSGFDKSGSSTTRTPAMSVIVDE (SEQ ID NO: 22).
- 10 Las soluciones se mezclaron de modo que la concentración de Trx-His- Δ N28-CofB era 1 μ M y la concentración de CofJ¹⁻²⁴-GCN4 era 0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 μ M, y se dejaron en reposo sobre hielo durante la noche. Además, se mezcló CofJ de manera que la concentración final llegó a ser 1 μ M, y las mezclas se dejaron en reposo sobre hielo durante 1 hora, para obtener muestras experimentales. Cada muestra se aplicó a una columna de Ni equilibrada con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0, y la columna se lavó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 15 mM, pH 8,0. A continuación, la elución se realizó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 300 mM, pH 8,0 y la fracción eluida se confirmó mediante SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la FIG. 11. Se aclaró que la unión de CofJ y Trx-His- Δ N28-CofB se puede inhibir fuertemente mezclando preliminarmente CofJ¹⁻²⁴-GCN4 que tiene una concentración no inferior a la de CofJ con Trx-His- Δ N28-CofB, como se muestra en la FIG. 11
- 15

- 20 También con el péptido CofJ¹⁻²⁴ y CofJpepR, la capacidad de inhibición de los mismos se investigó mediante el mismo método. Específicamente, las soluciones mezcladas para que la concentración de Trx-His- Δ N28-CofB fuera 1 μ M y la concentración de péptido CofJ¹⁻²⁴ y CofJpepR fuera 1000 μ M, se dejaron reposar sobre hielo durante la noche. Además, se mezcló CofJ de manera que la concentración final llegó a ser 1 μ M, y las mezclas se dejaron en reposo sobre hielo durante 1 hora, para obtener muestras experimentales. El ensayo de extracción se realizó de la misma manera que como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la FIG. 12. Se aclaró que aunque el péptido CofJ¹⁻²⁴ se añade previamente a una concentración que es 1000 veces la de CofJ, la unión de CofJ y Trx-His- Δ N28-CofB difícilmente se puede inhibir, como se muestra en la FIG. 12. Además, se aclaró que la unión no se puede inhibir en absoluto con CofJpepR. Por ello, se considera que CofJ¹⁻²⁴-GCN4 puede inhibir la unión entre CofB y CofJ al unirse fuertemente con CofB mediante trimerización.
- 25

(Ejemplo 9) Evaluación de la actividad inhibidora de la adhesión de ETEC del péptido inhibidor usando células Caco2

- 30 El experimento de colonización se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. En el experimento, se prepararon mezclas de modo que la concentración de CofJ¹⁻²⁴-GCN4 era 0, 10, 100, 1000 μ g/mL y la concentración de HB101 cof era de $1,0 \times 10^9$ células/mL, luego, las mezclas se dejaron reposar a 25°C durante 1 hora, y se añadieron 50 μ L de las mezclas a cada 500 μ L de medio para que la concentración de CofJ¹⁻²⁴-GCN4 fuera 0, 1, 10, 100 μ g/mL y la concentración de HB101 cof fuera de $1,0 \times 10^8$ células/mL. Los resultados se muestran en la FIG. 13. Como se muestra en la FIG. 13, la tasa de recuperación era del 14,7% para 0 μ g/ml de CofJ¹⁻²⁴-GCN4, 14,0% para 1 μ g/ml de CofJ¹⁻²⁴-GCN4, 11,5% para 10 μ g/ml de CofJ¹⁻¹⁴-GCN4 y 2,6% para 100 μ g/mL de CofJ¹⁻²⁴-GCN4.
- 35

Se aclaró a partir de los resultados que CofJ¹⁻²⁴-GCN4 inhibe la colonización de HB101 cof en células Caco2 de manera dependiente de la concentración.

(Ejemplo 10) Análisis de la interacción entre el péptido CofJ⁴⁻¹⁶ y Δ N28-CofB mediante ITC

- 40 Hasta ahora se ha mostrado que el péptido CofJ¹⁻²⁴ inhibe las interacciones entre CofB/CofJ, lo que inhibe la adhesión de ETEC al tejido intestinal. Se supone a partir de la estructura cristalina del complejo péptido CofJ¹⁻²⁴/ Δ N28-CofB que una parte del péptido CofJ¹⁻²⁴, específicamente, de la quinta serina a la decimoquinta prolina están particularmente involucradas en la interacción de ambos, tal y como se muestra en la FIG. 7, como se ha descrito anteriormente. Luego, se investigó si un péptido CofJ⁴⁻¹⁶ (SEQ ID NO: 23) compuesto por las secuencias de los aminoácidos 4^º a 16^º del péptido CofJ¹⁻²⁴, que contiene una porción que se considera especialmente importante en el péptido CofJ¹⁻²⁴, puede ejercer el efecto equivalente al péptido CofJ¹⁻²⁴.
- 45

- Primero, para investigar la contribución a la unión de los pili del péptido CofJ⁴⁻¹⁶, se llevó a cabo un análisis de la interacción entre un péptido CofJ⁴⁻¹⁶ sintético (adquirido en Scrum Co., Ltd.) y Δ N28-CofB, usando un calorímetro de titulación isotérmica Microcal ITC 200 (fabricado por GE Healthcare) de la misma manera que el experimento realizado en el Ejemplo 3. Específicamente, una solución de péptido CofJ⁴⁻¹⁶ 2 mM se cargó en una jeringa de titulación y una solución de Δ N28-CofB 33,9 μ M (en términos de trímero) se cargó en una celda de medición, respectivamente, y la interacción de los mismos se evaluó observando directamente los cambios térmicos que ocurrían al gotear la solución de péptido CofJ⁴⁻¹⁶ en la solución de Δ N28-CofB. Se observó un cambio exotérmico al gotear la solución de péptido CofJ⁴⁻¹⁶, que convergía al mismo nivel que el calor de dilución a medida que avanzaba la titulación. Como resultado del análisis de los datos obtenidos mediante un programa informático de análisis Origin, se observó la unión del péptido CofJ⁴⁻¹⁶ y Δ N28-CofB. El valor de la constante de disociación K_d de ambos era 4 μ M.
- 50
- 55

De lo anterior, se sugirió que el péptido CofJ⁴⁻¹⁶ puede unirse a CofB, como el péptido CofJ¹⁻²⁴.

(Ejemplo 11) Diseño del péptido CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4

A continuación, para preparar un péptido trímero también para CofJ⁴⁻¹⁶, se intentó la preparación de un péptido CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 usando GCN4 que tiene un dominio de trimerización y un enlazador, de la misma manera que en el Ejemplo 6.

El plásmido de expresión de un péptido inhibidor (denominado CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4) en el que un péptido CofJ⁴⁻¹⁶ se fusionaba con GCN4 usando un enlazador (TSGGG), se construyó de la siguiente manera. Los sitios de las enzimas de restricción BamHI y SpeI que se habían incorporado previamente en ambos extremos de la secuencia del péptido CofJ¹⁻²⁴ en el plásmido de expresión de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4, se escindieron usando ambas enzimas de restricción y luego se purificaron. Mezclando y volviendo a aparear el oligonucleótido 1: 5'-GATCCAGCGAAGGTGGTGGCTTTTCACCGTTAACATGCCGAAGA-3' (SEQ ID NO: 24) y el oligonucleótido 2: 5'-CTAGTCTTCGGCATGTTAACGGTGAAAGCACCTTCGCTG-3' (SEQ ID NO: 25) que contenía la secuencia de CofJ⁴⁻¹⁶, se preparó un ADN de doble cadena, que luego se ligó con un vector purificado, para obtener un plásmido de expresión de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4.

A continuación, se transformó una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NIPPON GENE) con un plásmido para expresar CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4. Las colonias se recogieron, se añadieron a medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina y se cultivaron con agitación durante la noche a 37°C. A la mañana siguiente, se añadió todo el líquido del cultivo al medio de cultivo principal y se amplificó y cultivó con agitación a 37°C. Cuando se alcanzó una DO₆₆₀ = 0,6, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se agitó a 25°C durante 18 horas para inducir la expresión. El cuerpo microbiano inducido por la expresión se recuperó mediante centrifugación a 4000 G y 4°C durante 7 minutos. El cuerpo microbiano resultante se disolvió en un tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,0) sobre hielo, luego se añadió lisozima a 20 µg/mL y Triton X-100 al 0,2 % y la muestra se dejó reposar durante 15 minutos, luego, se repitió 15 veces el ciclo de ruptura ultrasónica durante 15 segundos y descanso durante 1 minuto. La solución ultrasónica con ruptura se centrifugó a 20000 G y 4°C durante 1 hora, y el material sobrenadante de la centrifugación se filtró a través de un filtro de 0,8 µm. La muestra filtrada se aplicó a una columna GST (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow: GE Healthcare Biosciences) equilibrada con un tampón de lisis. La columna GST se lavó con un tampón de lisis, luego se eluyó con un tampón de elución (Tris-HCl 20 mM, GSH 20 mM, pH 8,0). La muestra eluida se dializó con un tampón de diálisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) mientras se trataba enzimáticamente con 30 unidades de proteasa Turbo 3C Protease (Accelagen), para escindir el marcador GST y CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4. La muestra después de la escisión se aplicó sobre la columna GST, para separar el marcador GST y CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4. La muestra recuperada se aplicó sobre una columna Hitrap DEAE (GE Healthcare Biosciences) equilibrada con un tampón de diálisis y se recuperó la fracción no unida a la columna. La muestra resultante se aplicó a una columna Superdex 75 (26/60) (GE Healthcare Biosciences) equilibrada con un tampón de filtración en gel (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) para obtener un producto final purificado.

El producto final purificado resultante está constituido por 4 residuos de la secuencia obtenida a partir del vector (GPLG), 13 residuos obtenidos a partir de la región N-terminal de CofJ (SSEGGAFTVNMPK: SEQ ID NO: 23), 5 residuos de una secuencia enlazadora (TSGGG: SEQ ID NO: 9) y 30 residuos de una secuencia de GCN4 (RMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKL: SEQ ID NO: 6), del lado N-terminal. Se denominó péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4.

(Ejemplo 12) Análisis de la interacción entre el péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 y ΔN28-CofB mediante ITC

Para investigar la contribución a la unión a los pili del péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 obtenido en el Ejemplo 11, se llevó a cabo un análisis de la interacción entre el péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 y ΔN28-CofB, usando un calorímetro de titulación isotérmica Microcal iTC200 (fabricado por GE Healthcare). Una solución de péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 0,59 mM se cargó en una jeringa de titulación y una solución de ΔN28-CofB 28,5 µM (en términos de trímero) se cargó en una celda de medición, respectivamente, y se evaluó la interacción de ambos mediante la observación directa de los cambios térmicos que ocurrían al gotear la solución del péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 en la solución de ΔN28-CofB. Se observó un cambio exotérmico al gotear la solución de péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4, que convergía al mismo nivel que el calor de dilución a medida que avanzaba la titulación. Como resultado del análisis de los datos obtenidos mediante un programa informático de análisis Origin, se observó la unión del péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 y ΔN28-CofB. El valor de la constante de disociación K_d de ambos era 0,08 µM.

Como resultado del análisis, se mostró que la afinidad de unión entre el péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 y ΔN28-CofB era aproximadamente 2,5 veces más fuerte que en comparación con la afinidad de unión entre CofJ y ΔN28-CofB y se aclaró que el péptido inhibidor del tipo fusión con GCN4 inhibe eficazmente la interacción entre CofJ y ΔN28-CofB.

(Ejemplo 13) Inhibición de la interacción entre CofB/CofJ a través del péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 mediante un ensayo de precipitación

Para investigar si el péptido inhibidor CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 puede inhibir la unión de CofB y CofJ, esto se confirmó en el sistema experimental *in vitro*, mediante un ensayo de precipitación utilizando una columna de Ni. Para el experimento, se utilizó ΔN28-CofB (Trx-His-ΔN28-CofB), CofJ y CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4, con marcador de tiorredoxina (Trx) y marcador His (His) añadidos.

Las soluciones mezcladas de modo que la concentración de Trx-His-ΔN28-CofB era 1 µM y la concentración de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 era (0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 µM), se dejaron en reposo sobre hielo durante la noche. Además, se mezcló

CofJ de manera que la concentración final llegó a ser 1 μ M, y las mezclas se dejaron en reposo sobre hielo durante 1 hora, para obtener muestras experimentales. Cada muestra se aplicó a una columna de Ni equilibrada con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0, y la columna se lavó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 15 mM, pH 8,0. A continuación, la elución se realizó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 300 mM, pH 8,0, y la fracción eluida se confirmó mediante SDS-PAGE. Como resultado, se aclaró que la unión de CofJ y Trx-His- Δ N28-CofB puede inhibirse fuertemente mezclando preliminarmente CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 que tiene una concentración no inferior a la de CofJ con Trx-His- Δ N28-CofB, como se muestra en la FIG. 14

(Ejemplo 14) Evaluación de la actividad inhibidora de la adhesión de ETEC de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 usando células Caco2

La actividad inhibidora de la adhesión de ETEC se evaluó de la misma manera que en el Ejemplo 9 usando CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4.

Se prepararon mezclas de modo que la concentración de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 era 0, 10, 100, 1000 μ g/mL y la concentración de HB101 cof era de $1,0 \times 10^9$ células/mL, luego, las mezclas se dejaron reposar a 25°C durante 1 hora, y se añadieron 50 μ L de las mezclas a cada 500 μ L de medio para que la concentración de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 fuera 0, 1, 10, 100 μ g/mL y la concentración de HB101 cof fuera de $1,0 \times 10^8$ células/mL. Como resultado, tal y como se muestra en la FIG. 15, la tasa de recuperación era del 1,01% para 0 μ g/mL de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4, 0,32% para 1 μ g/mL de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4, 0,36% para 10 μ g/mL de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 y 0,068% para 100 μ g/mL de CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4.

Se aclaró a partir de los resultados que CofJ⁴⁻¹⁶-GCN4 inhibe la colonización con HB101 cof de células Caco2 de una manera dependiente de la concentración.

Listado de secuencias

<110> Biken-Biomics, Osaka University

<120> Péptido que inhibe la colonización por bacterias patógenas y agente inhibidor de la colonización que incluye el mismo

<130> CP01137PCT

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 1

Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Glu	Gly	Gly	Ala	Phe	Thr	Val	Asn	Met	Pro	Lys
1				5					10					15	

Thr	Ser	Thr	Val	Asp	Asp	Ile	Arg
			20				

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 2

Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Glu	Gly	Gly	Ala	Phe	Thr	Val	Lys	Met	Ala	Lys
1				5					10					15	

Ser	Ser	Thr	Val	Asp	Asp	Ile	Lys	Gly
			20					25

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 3
 Ser Ala Lys Ser Ser Gln Asn Tyr Gly Phe Ser Ala Gly Val Lys Pro
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400> 4
 Phe Asn Asp Asn Tyr Ser Ser Thr Ser Thr Val Tyr Ala Thr Ser Asn
 1 5 10 15
 Glu Ala Thr Asp Ser Arg Gly Ser Glu His Leu Arg Tyr Pro Tyr Leu
 20 25 30

Glu

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400> 5
 Ser Glu Gly Gly Ala Phe Thr Val Asn Met Pro
 1 5 10

<210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400> 6
 Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile
 20 25 30

<210> 7
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400> 7
 Pro Pro Gly
 1

<210> 8
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Xaa es 4Hyp

<400> 8
 Pro Xaa Gly
 1

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400> 9
 Thr Ser Gly Gly Gly
 1 5

5 <210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <400> 10
 gcgcccgggt cgccatcctc ttcagaagg 29

15 <210> 11
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <400> 11
 caagaattct tattaatcaa ggccacaagc cttc 34

25 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <400> 12
 ggttgcccaa cttggaaac 20

35 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <400> 13
 acccagaccc ggttcctga aagag 25

45 <210> 14
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <400> 14
 gtccacata tgagcccgct ttcagcgaa ggtggtgctt tcaccgtaa c 51

55 <210> 15
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <400> 15
 gacctctact gttgacgata tccgtactag tggtagcggt cgtatgaaac agatc 55

65 <210> 16
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70 <400> 16
 gatcgaggaa atcctgtcca agatctacca catcgaaaac gagatcgcg 50

75 <210> 17
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<400> 17
ggatatcgtc aacagtagag gtcttcggca tgtaacggt gaaagcacca cc 52

5 <210> 18
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <400> 18
cttgacagc atttctcga tctgtcttc gatctgttc atacgaccgc c 51

<210> 19
<211> 52
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<400> 19
ctagctctgc agttagataa gcttctgat acgcgcgac tcgtttcga tg 52

20 <210> 20
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <400> 20
gtccaggat ccccgcttc cagcgaaggt g 31

<210> 21
<211> 31
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 21
ggtgctcgag ttagataagc ttcttg 26

35 <210> 22
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <400> 22
Asn Pro Ser Gly Phe Asp Lys Ser Gly Ser Ser Thr Thr Arg Thr Pro
1 5 10 15

Ala Met Ser Val Ile Val Asp Glu
20

45 <210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 23
Ser Ser Glu Gly Gly Ala Phe Thr Val Asn Met Pro Lys
50 1 5 10

<210> 24
<211> 42
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<400> 24
gatccagcga agtggtgct ttcaccgta acatgccgaa ga 42

60 <210> 25

ES 2 913 257 T3

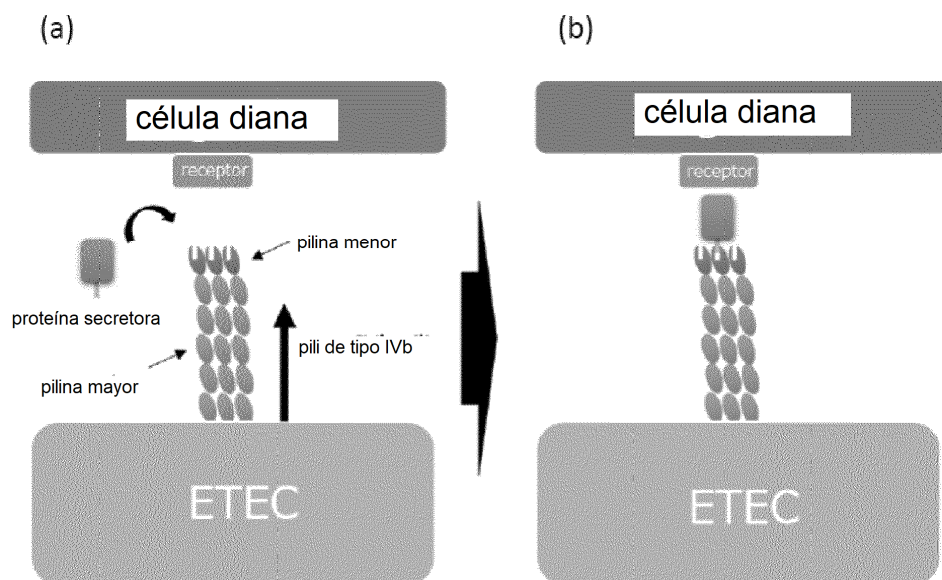
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <400> 25
ctagtcttcg gcatgttaac ggtgaaagca ccaccttcgc tg 42

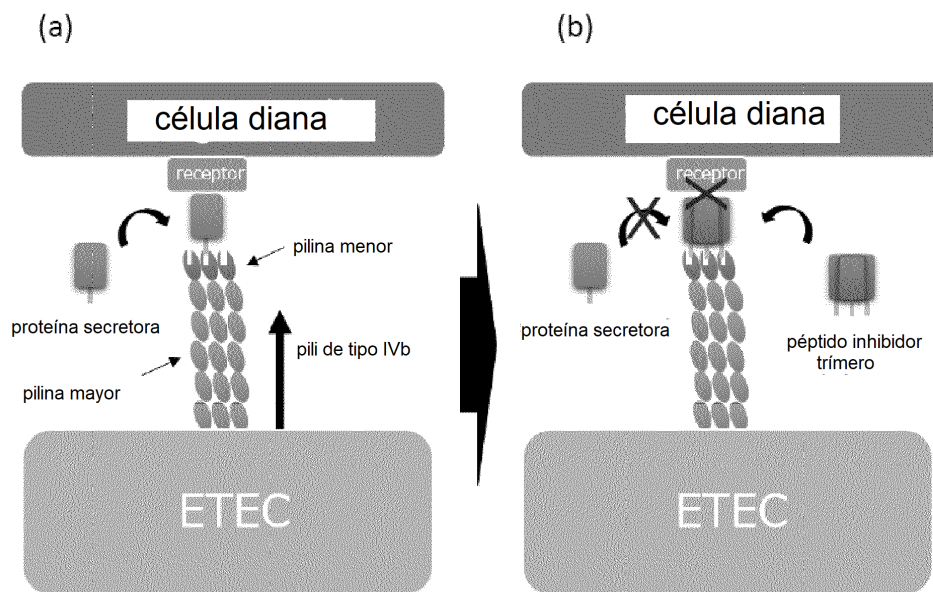
REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende
un primer dominio que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 5 y 23, y es capaz de unirse a la pilina menor de los pili de tipo IVb, y
- 5 un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos conectada a través de una secuencia enlazadora con dicho primer dominio, y es capaz de trimerización,
en donde dicho segundo dominio tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que repite de 4 a 10 veces la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.
2. El péptido según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia enlazadora es SEQ ID NO: 9.
- 10 3. Un inhibidor de la colonización de bacterias patógenas en los órganos digestivos, que comprende el péptido según la reivindicación 1 o 2.

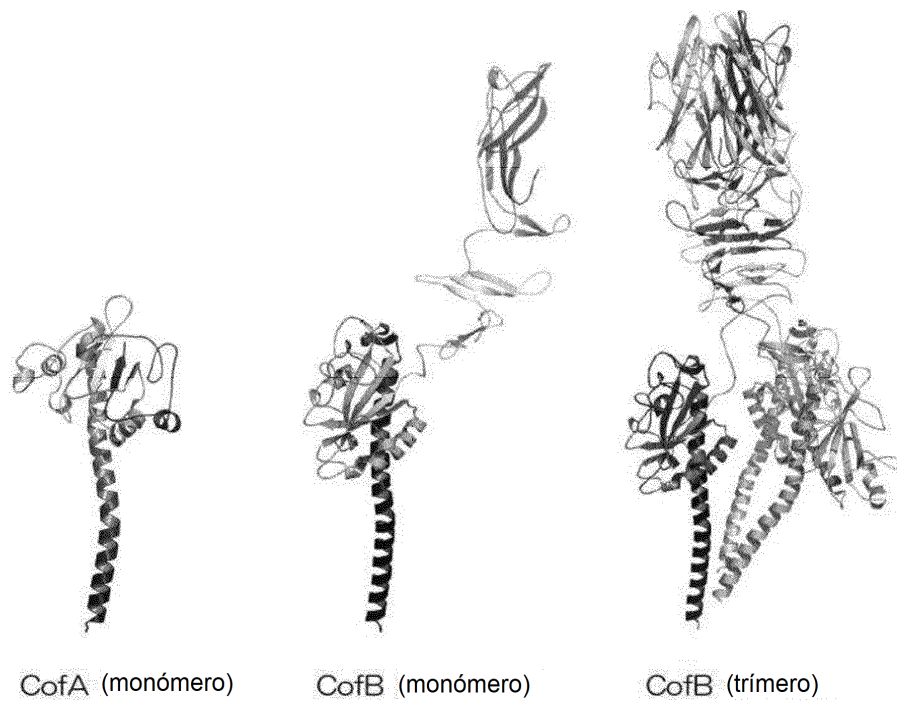
[FIG.1]



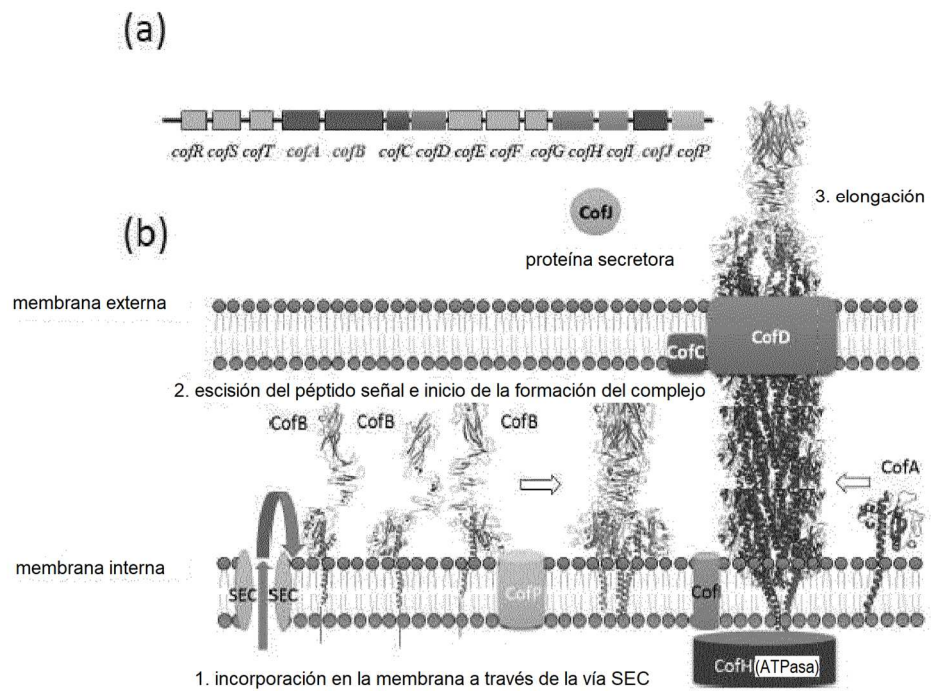
[FIG. 2]



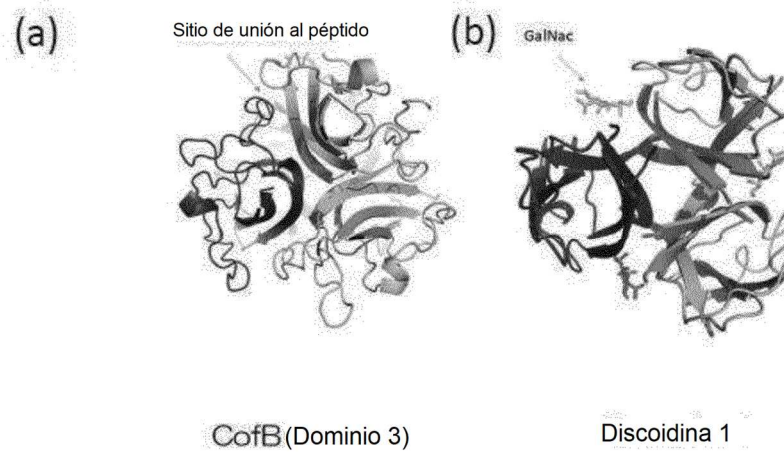
[FIG.3]



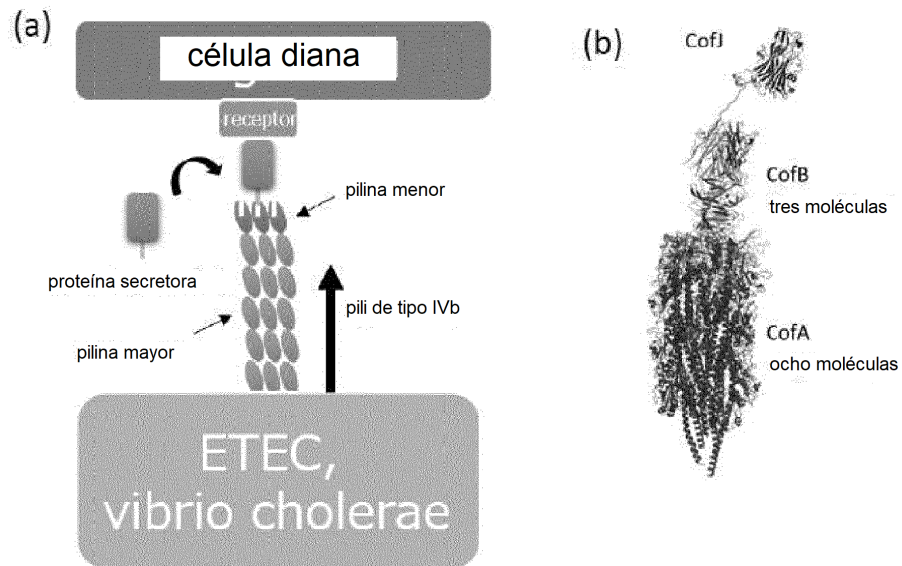
[FIG.4]



[FIG.5]

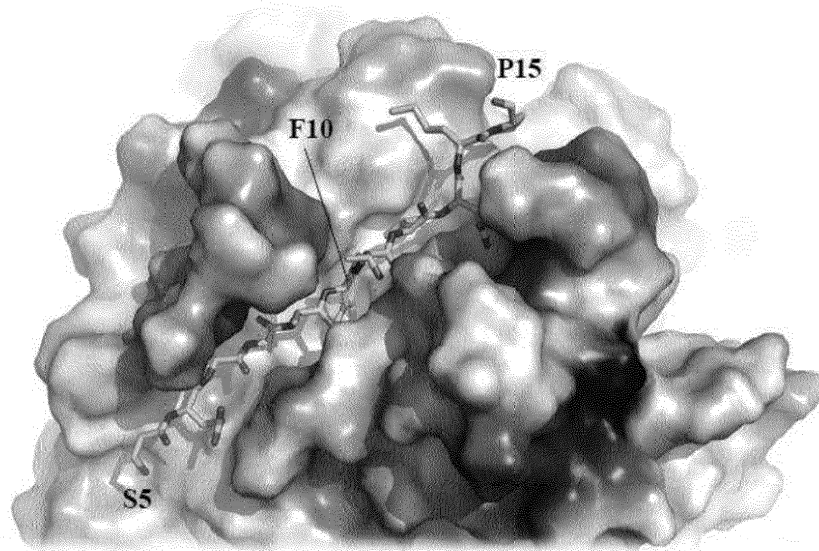


[FIG.6]

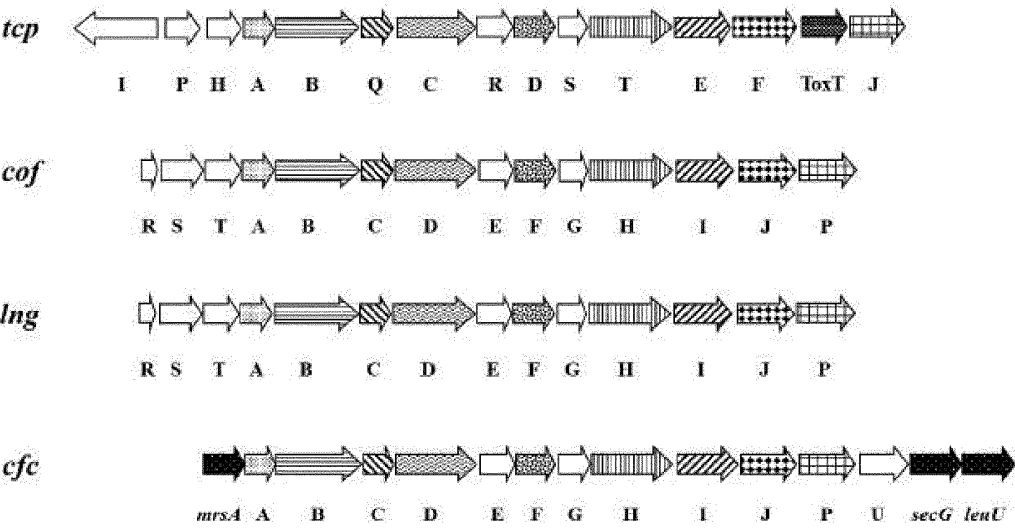


[FIG.7]

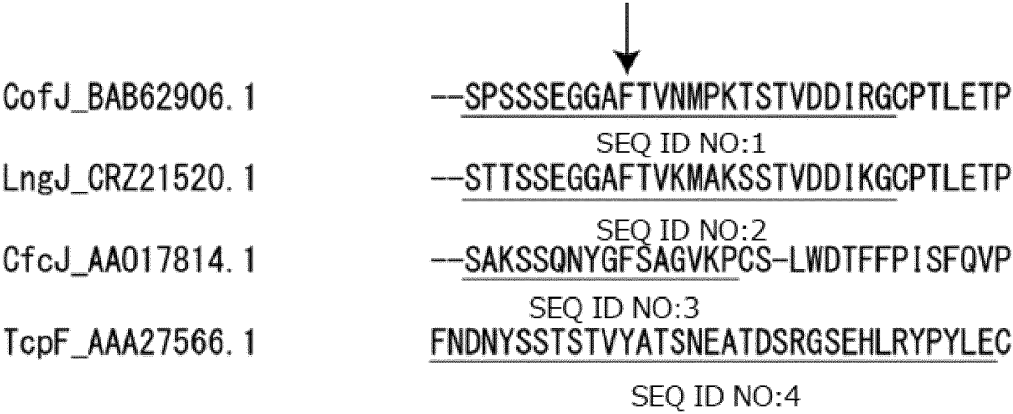
CofJ¹⁻²⁴; complejo de S (1) PSSSEGGAFTVNMPKTSTVDDIR (24) y CofB



[FIG.8]

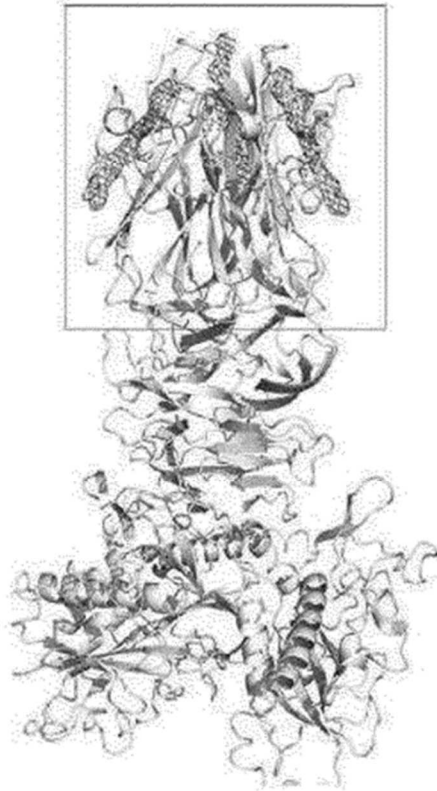


[FIG.9]

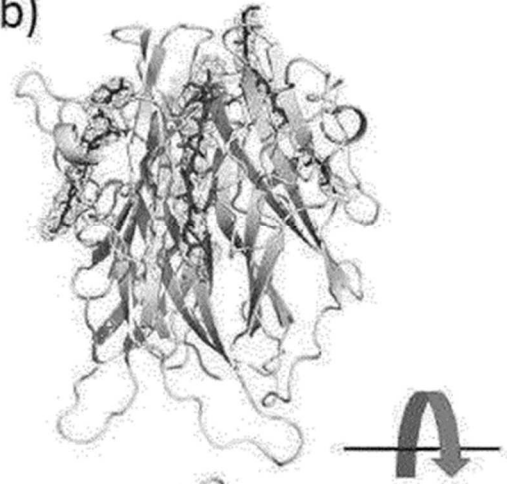


[FIG.10]

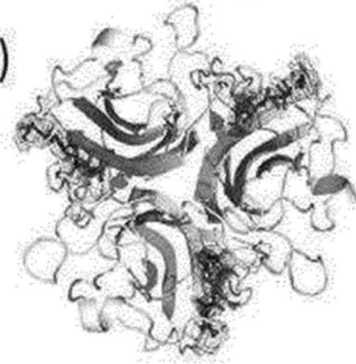
(a) estructura general



(b)



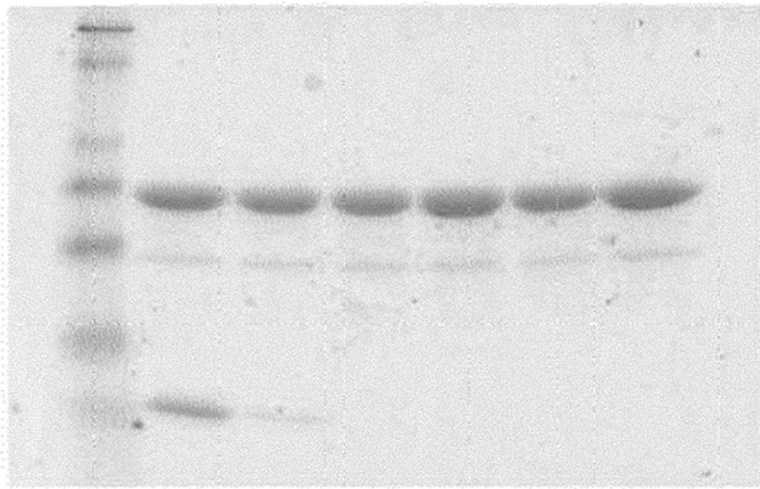
(c)



[FIG.11]

concentración de CofJ¹⁻²⁴-GCN4

0 0.5 1 2 5 10 (μM)



←Trx-His-ΔN28-CofB

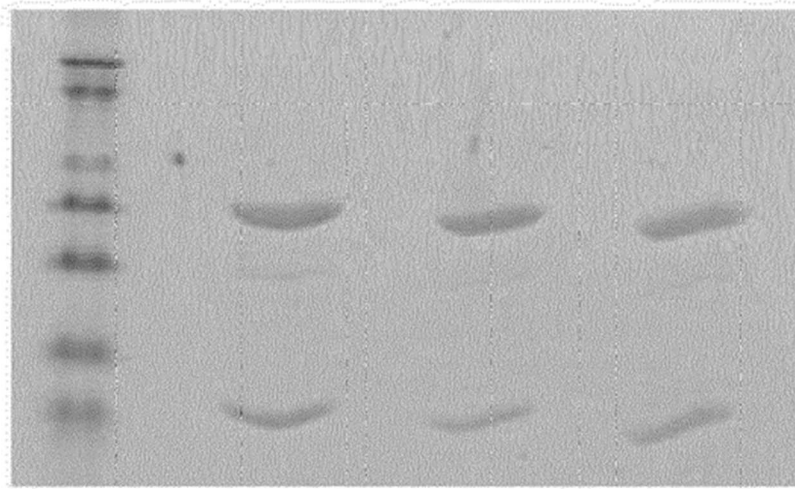
←CofJ

[FIG.12]

Control
negativo

CofJ¹⁻²⁴
1000μM

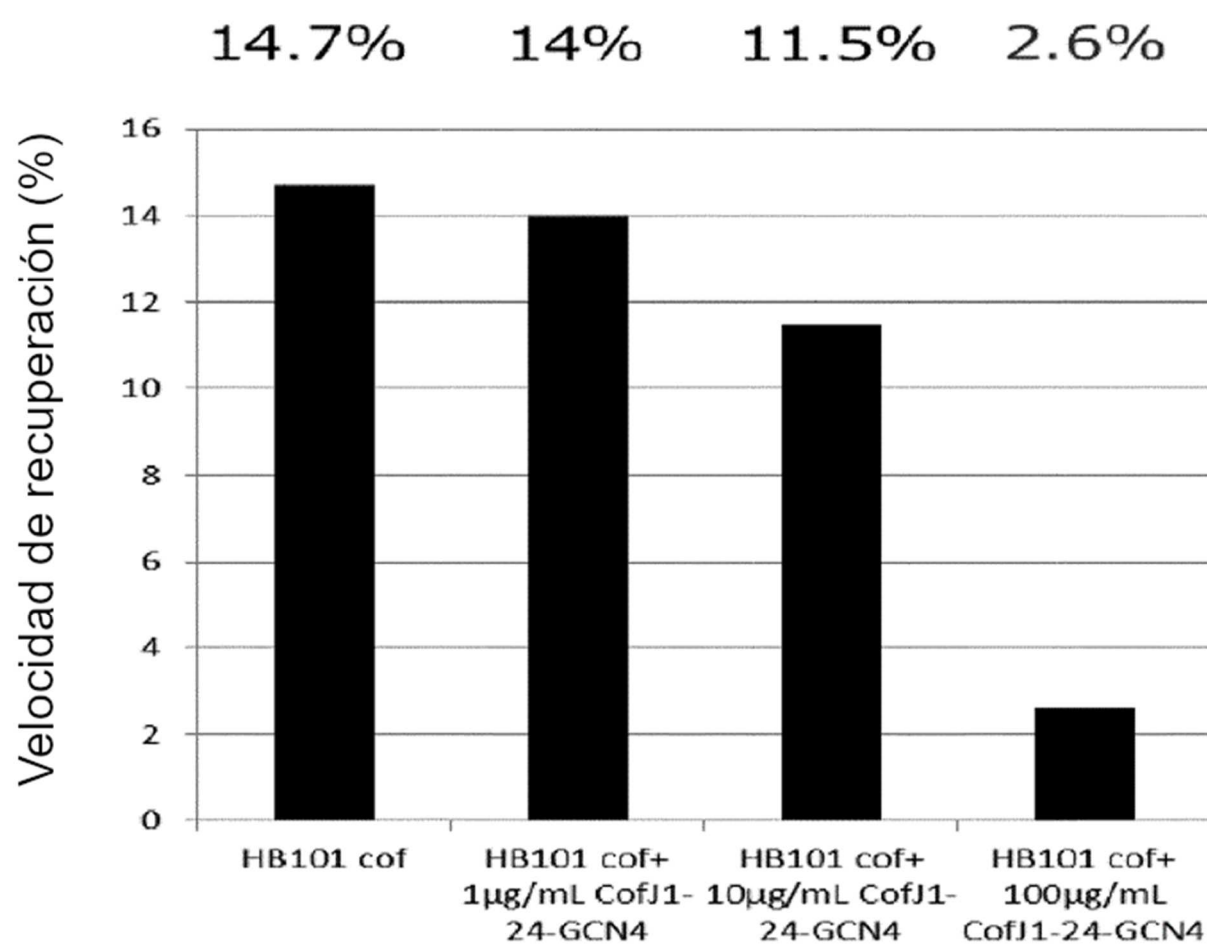
CofJpepR
1000μM



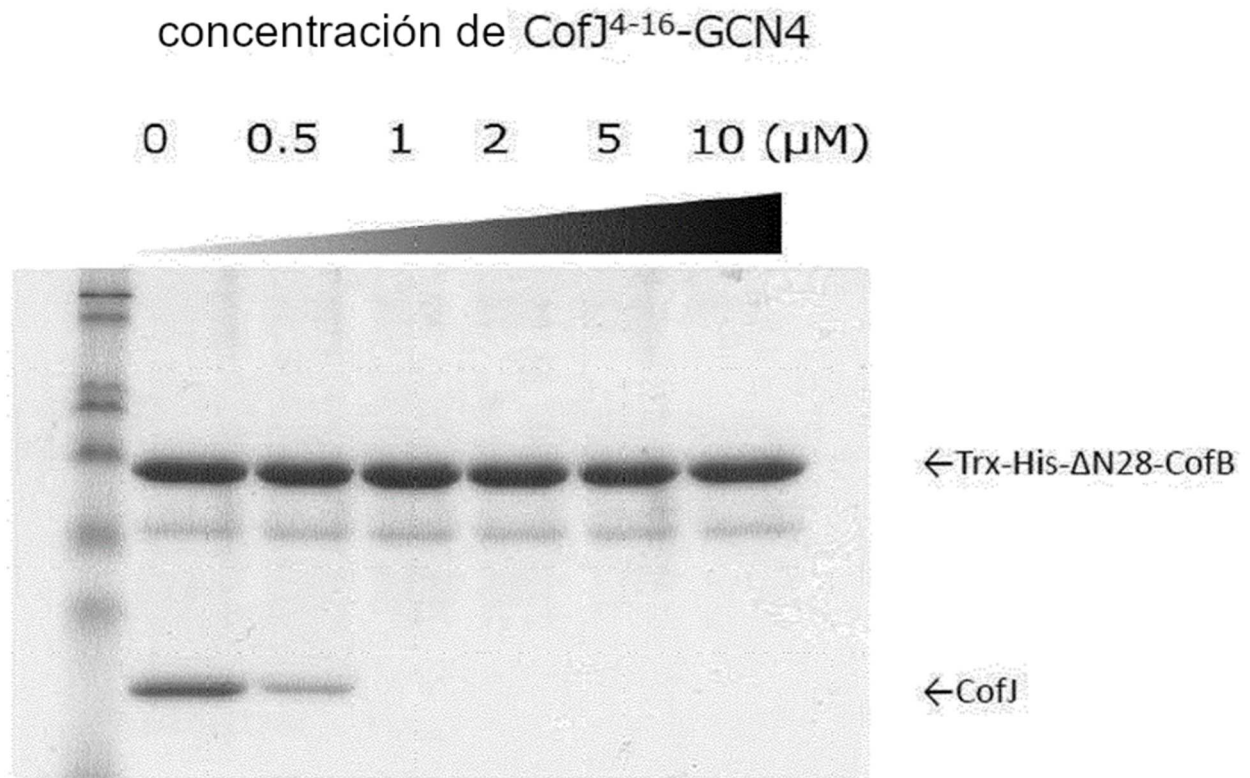
←Trx-His-ΔN28-CofB

←CofJ

[FIG.13]



[FIG.14]



[FIG.15]

