



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: **ES 2 076 895**

⑫ Número de solicitud: 9400202

⑤① Int. Cl.⁶: C07K 14/245

C07K 1/36

A61K 39/108

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **04.02.94**

⑫ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.95**

Fecha de concesión: **19.06.96**

⑫ Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.96**

⑫ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.08.96

⑦③ Titular/es: **Industrial Farmacéutica y
de Especialidades S.A.
Alameda de Urquijo, 27
48008 Bilbao, Vizcaya, ES**

⑦② Inventor/es: **Martinez Quesada, Jorge;
Martinez Gárate, Alberto y
Palacios Peláez, Ricardo**

⑦④ Agente: **Ungría Goiburu, Bernardo**

⑤④ Título: **Fimbrias-Adhesinas de tipo 1 y p aisladas de nuevas cepas de E. Coli, procedimiento para su obtención y aplicaciones.**

⑤⑦ Resumen:

Fimbrias-Adhesinas de tipo 1 y P aisladas de nuevas cepas de E. coli, procedimiento para su obtención y aplicaciones.

Las fimbrias adhesinas tienen un peso molecular de 2×10^5 y 2×10^7 Da, y comprenden 90-95 por ciento de proteínas y 1-3 por ciento de azúcares.

Las fimbrias de Tipo 1 muestran 5 fracciones proteicas diferentes de 14-20 kDa estando asociada la mayoría a carbohidratos. Las fimbrias de Tipo P también incluyen 5 fracciones proteicas diferentes de 14-20 kDa estando una de las mayoritarias asociada a carbohidratos.

El procedimiento comprende: cultivar cepas de E. coli CECT 4484 y CECT 4485; recoger el sedimento por centrifugación, resuspenderlo en suero fisiológico y homogeneizar; centrifugar el homogeneizado recogiendo el sobrenadante, que se somete a precipitación salina, reconstituir el precipitado y dializar la solución; tratar el dializado con desoxicolato sódico y, someter el producto a dos cromatografías sucesivas con Sephacryl S-200 y Sepharosa 4B.

Aplicación en el tratamiento y prevención de las infecciones del tracto urinario producidas por E. coli fimbriadas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 076 895 B1

DESCRIPCION

Fimbrias-adhesinas de tipo 1 y P aisladas de nuevas cepas de E. Coli, procedimiento para su obtención y aplicaciones.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de los productos destinados al tratamiento y prevención de las infecciones del tracto urinario.

De modo más concreto, la presente invención proporciona fimbrias aisladas de nuevas cepas de E.coli en un estado altamente purificado que se han mostrado muy eficaces para los fines previstos, en animales. Por lo tanto, dichas fimbrias son potencialmente útiles para la prevención y el tratamiento de las referidas infecciones en humanos.

Las mencionadas nuevas cepas de E. coli son concretamente *Escherichia coli* CECT 4484 y *Escherichia coli* CECT 4485 depositadas por el solicitante en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia el 19 de Enero de 1.994, de acuerdo con el "Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes", resultando ambas cepas viables en condiciones de "Resiembra en medios de cultivo adecuados" en el momento del depósito.

Estado de la técnica anterior a la invención

Escherichia coli es el agente etiológico más frecuente de las infecciones del tracto urinario, que causan síntomas de la cistitis aguda y crónica, así como pielonefritis y bacteriurias asintomáticas [(1) Problemática de las infecciones urinarias en España. Liade. 1.989; (2) Woodrow GC, Levine MM. New generation vaccines. 1.990].

Se sabe que las infecciones del tracto urinario son causadas por cepas de *Escherichia coli* que contienen estructuras adhesínicas que son capaces de unirse a receptores de las célula uroepiteliales [(3) Jonhson JM. Virulence factors in E.coli UTI. Clin Microbiol Reviews 1991; 4: 80-128] y que dichas estructuras son una de las principales causas de patogenicidad de estos organismos en el tracto urinario (3). Estas estructuras están compuestas de subunidades protéicas con conformación tubular que contienen una región terminal y/o lateral por donde se une al receptor [(3) y (4) Brinton CC. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. Trans NY Acad Sci 1965; 27: 1003-1054]. Dichas estructuras se denominan fimbrias y se han determinado varias familias que están asociadas a factores de virulencia: fimbrias manosa resistentes (tipo P:P, F ó NAP, tipo X ó Dr "related":5, M, 6) y fimbrias manosa sensibles (tipo 1) (3). Las adhesinas manosa resistentes tipo X,AFA-I y AFA-III no están asociadas a estructuras fimbriales. Ambos tipos de fimbrias han sido ensayados como agentes preventivos y/o protectores de la infección del tracto urinario por E. coli uropatógena [(5) Hagberg L, Leffler H, Svanborg-Eden C. Non-antibiotic prevention of UTI: Infection 1985; 13 (Suppl.2): 196-200; (6) O'Hanley P, Lark D, Falkow S, Schoolnik G. Molecular basis of E. coli colonization of the upper urinary tract in Balb/c mice. J Clin Invest 1985; 75: 347-360; (7) Hutlgren SJ, Porter TN, Schaeffer AJ, Duncan JL. Role of type I pili and effects of phase variation on lower UTI produced by E. coli. Infect Immun 1985; 50: 370-377; (8) Silverblatt FS, Weinstein R, Rene P. Protection against experimental pyelonephritis by antibodies to pili. Science J Infect Dis 1982; suppl. 33: 79-82].

El objeto del estudio fue purificar e identificar fimbrias-adhesinas de E. coli uropatógenas aisladas de muestras de orina procedentes de mujeres con cistitis recidivantes, para utilizarlas como producto para el tratamiento preventivo de las infecciones del tracto urinario.

Existen ya estudios realizados sobre producción y efectividad de fimbrias de E. Coli utilizadas como vacunas para la prevención de infecciones del tracto urinario. Así, además de la publicación de Pecha y cols. [(9) Pecha B, Low D, O'Hanley P. Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonefritis by piliated E. coli in murine model. J Clin Invest 1989; 83:2102-2108], pueden citarse las siguientes patentes:

- Patente DE3832785 relativa al aislamiento de p-adhesina a partir de células de E. coli y al uso de las mismas para inmunización, producción de anticuerpos y diagnóstico.
- Patente EP-342173 relativa a una nueva proteína enlazante de fibronectina expresada como fimbria

sobre E. coli y a secuencias codificantes de ADN híbrido, para prevenir infecciones de E. coli mediante vacunación o aplicación tópica.

- Patente EP-314224 relativa a una vacuna para la protección de las aves de corral contra septicemia por E. coli que contiene secciones inmunogénicas o fimbrias tipo FII, o anticuerpos contra éstos.
- Patente EP-249739 relativa a una vacuna para inmunización contra infecciones del tracto urinario que comprende fimbrias con fimbrias de la misma familia fimbria que las de los organismos infectantes.
- Patente EP-179887 relativa a un antígeno que comprende un determinante polipeptídico de adhesina, útil en la inmunización contra las infecciones bacterianas y en la producción de anticuerpos para el diagnóstico de las infecciones.
- Patente EP-161095 relativa a vacunas contra infecciones del tracto urinario conteniendo fragmentos o proteínas de fimbrias gal-gal de E. Coli.
- Patente 0546584 relativa a la preparación de vacunas a base de Escherichia coli con aplicaciones farmacológicas para prevenir o curar la gastroenteritis.

Frente al estado de la técnica actual anteriormente expuesto, la presente invención propone la obtención y purificación de fimbrias-adhesinas de tipo 1 y de tipo P, a partir de nuevas cepas de E. coli aisladas de orinas de mujeres con cistitis recidivantes, con determinadas características que se indicarán más adelante. Mediante la presente invención es posible obtener fimbrias-adhesinas intactas libres de otras proteínas o estructuras tales como flagelos, hemolisina y LPS que podrían afectar al destino del producto y, además, asegurar la eliminación de las sustancias tóxicas que pudieran cohabitar con el producto en cuestión.

Por otra parte, la práctica total ausencia de reactividad cruzada entre las fimbrias-adhesinas de tipo 1 y las de tipo P aquí aisladas, permiten fabricar inmunógenos que posean tanto cada uno de los tipos de fimbria por separado, como los dos tipos de fimbria-adhesina a la misma concentración y que han mostrado capacidad protectora en los estudios efectuados.

Además, la verificación de la capacidad de adherencia de las cepas de E. coli asociada a las fimbrias, permite trabajar con un material que induce inmunorrespuesta contra la fracción adhesínica de la misma causante de la fijación de E. coli a las células uroepiteliales.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Es una microfotografía, tomada por técnicas de microscopía electrónica, de las fimbrias purificadas procedentes de la cepa de E. Coli CECT 4484.

Figura 2: Es una microfotografía, tomada por técnicas de microscopía electrónica, de las fimbrias purificadas procedentes de la cepa de E. Coli CECT 4485.

Figura 3: Es una representación gráfica de los resultados del estudio ELISA Inhibición de uropatógenos con fimbrias tipo 1 en fase sólida.

Figura 4: Es una representación gráfica de los resultados del estudio ELISA Inhibición de uropatógenos con fimbrias tipo P en fase sólida.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a fimbrias-adhesinas de tipo 1 y P aisladas de nuevas cepas de E. Coli, a un procedimiento para su obtención y a sus aplicaciones.

El procedimiento de la presente invención se basa en el ya clásico descrito por Brinton (4), empleándose como material de partida nuevas cepas de E. coli uropatógenas aisladas de orinas de mujeres con cistitis recidivantes, en las que se comprobó que había adhesinas asociadas a fimbrias de tipo 1 y de tipo P.

ES 2 076 895 B1

Concretamente se partió de las cepas de E. coli CECT 4484 y CECT 4485, cuyas características se indican en la siguiente tabla 1:

Tabla 1

Cepas CECT 4484 y CECT4485 de E. coli uropatógenas

Origen		Serotipo	Fimbria/PM subunidad principal kDa	Hemolisina	Adherencia
cepa	CECT 4484	Orina ♀ 04:K-	P/17,5	+	>100bact/cél. epitelial
cepa	CECT 4485	Orina ♀ 05:K13	1/18,5	+	>100bact/cél. epitelial

Las bacterias se siembran en un medio de cultivo líquido a 37°C hasta obtenerse cultivos en el inicio de la fase estacionaria (10^8 - 10^9 ufc/ml).

Los cultivos se centrifugan y el sedimento obtenido se lava mediante centrifugación, a fin de eliminar el medio de cultivo y los componentes que en él puedan existir.

Los sedimentos lavados conteniendo las bacterias y resuspendidos en soluciones salinas fisiológicas con pH neutro se homogeneizan, en frío, en un homogeneizador de aspas de 2 a 10 minutos, a una velocidad de 10.000 a 25.000 rpm.

Los homogeneizados se centrifugan a alta velocidad a unos 25.000-45.000 x g durante 20-45 minutos y se descarta el sedimento conteniendo las bacterias.

El sobrenadante conteniendo las fimbrias se recupera y se realizan varias precipitaciones salinas en frío (que pueden efectuarse con $MgCl_2$ o $(NH_4)_2SO_4$). La precipitación puede efectuarse durante un período amplio de tiempo que va de las 2 horas a toda la noche.

El material precipitado se recupera mediante centrifugación. Se reconstituye en soluciones acuosas fisiológicas de pH neutro, y acto seguido se dializa con el fin de eliminar los restos de las sales utilizadas para la precipitación, así como las moléculas inferiores a 10.000 Da.

Seguidamente, se tratan las fimbrias con desoxicolato sódico al 5% a 80°C aproximadamente con el fin de eliminar los lipopolisacáridos (LPS).

El material así obtenido (fimbrias intactas) se cromatografía en una columna de filtración en gel conteniendo Sephacryl S-200 (matriz para cromatografía formada por unión covalente de alil-destrano con N,N-metilen-bis-acrilamida, que da lugar a una malla rígida en forma de esferas de 25-75 μm con poros que permiten la inclusión de proteínas de 1.000 a 80.000 Da) y posteriormente el volumen de exclusión obtenido a partir de aquí, se cromatografía de nuevo por una columna de Sepharosa 4B (matriz para cromatografía formada por esferas de agarosa de 45-165 μm con muy pocos residuos de grupos con carga y con poros que permiten la inclusión de proteínas de 6×10^4 a 20×10^6 Da), con el fin de obtener fimbrias intactas libres de sustancias demasiado grandes, tales como flagelos o restos de membranas, etc. o de sustancias tóxicas de pesos moleculares intermedios o pequeños, tales como hemolisina, LPS. etc. que podrían afectar al destino del producto. Además, con ello se asegura también la eliminación de las sustancias tóxicas que pudieran cohabitar con el producto en cuestión.

El material contenido en el volumen de inclusión de la columna de Sepharosa 4B constituye el producto de la presente invención, que presenta un peso molecular comprendido entre 2×10^5 Da y 20×10^6 Da.

Este producto presenta una ausencia prácticamente total de reactividad cruzada entre las fimbrias-adhesinas de tipo 1 y las de tipo P aisladas según la presente invención lo que permite fabricar in-

munógenos que posean tanto cada uno de los tipos de fimbria por separado, como los tipos de fimbria-adhesina a la misma concentración y que se muestran con capacidad protectora en el moldeo experimental de infección del tracto urinario del ratón.

Además, la verificación de la capacidad de adherencia de las cepas *E. coli*, asociada a las fimbrias permite trabajar con un material que induce inmunorrespuesta contra la fracción adhesínica de la misma causante de la fijación de *E. coli* a las células uroepiteliales.

Una vez obtenidas las fimbrias, se han estudiado las características de las mismas, realizando determinaciones en el contenido total de azúcares, por el método de reducción de azúcares [(10) Park JT, Johnson MJ. A subminodetermination of glucose. *J. Biol Chem* 1949; 181:149-151; (11) Chaplin MF, Kennedy JF. Carbohydrate analysis. A practical approach. IRL Press. Oxford. Washington DC. 1986], así como del contenido total de proteínas, por el método de Sutherland [(12) Sutherland EW, Cosi CF. Haynes R, Olson NS. Purification of the hyperglycemic-glycogenolytic factor from insulin and from gastric mucosa. *J. Biol Chem* 1949; 180:825-837] o mediante espectrofotometría de UV.

Así, las fimbrias obtenidas por el procedimiento de la presente invención han mostrado tener el 90-95% en peso de proteínas y el 1-3% en peso de azúcares.

También se ha determinado el grado de polimerización de las fimbrias mediante medición espectofotométrica de la muestra en el rango de longitud de onda que comprende la región UV (350-195 nm) (4).

El SDS-PAGE efectuado en base a Mc. Michael [(13) Mc Michael J, Ou JT. Structure of common pili from *E. coli*. *J. Bacteriol* 1979; 138:969-975] ha puesto de manifiesto la presencia de fracciones de fimbria (diferenciables de las proteínas de membrana) por su distinta movilidad electroforética en presencia o ausencia de 2- β -Mercaptoetanol y que son perfectamente diferenciables entre los distintos tipo de fimbrias.

El estudio de la detección y diferenciación de carbohidratos mediante inmunodetección con lecitinas según J. Montreuil y cols. [(14) Montreuil J. Bouquelet S, Debray H, et al. Glycoproteins. Chapter 5 in MF Chaplin and JF Kennedy. Carbohydrate analysis. 1986. IRL Press. Oxford, Washington DC] pone de manifiesto la presencia de carbohidratos asociados a determinadas fracciones de las fimbrias de la siguiente forma:

- Las fimbrias de tipo 1, que muestran la presencia de 5 fracciones protéicas diferentes con PM comprendidos entre los 14 y los 20 kDa, tienen un componente mayoritario (55%) de 17-18 kDa que está asociado a carbohidratos;
- Las fimbrias de tipo P que muestran la presencia de 5 fracciones protéicas con PM comprendidos entre 14 y 20 kDa, tiene dos componentes mayoritarios (35% y 30%) de 19-20 kDa y 15 kDa respectivamente, de los cuales el primero está asociado a carbohidratos.

La cromatografía de filtración en gel mediante SMART SYSTEM pone de manifiesto la capacidad de reorganización de las subunidades de pilina para conformar fimbrias de alto peso molecular, así como para su posterior purificación.

El análisis de los carbohidratos asociados a las fimbrias-adhesinas mediante inmunodetección con lecitinas demuestra que dichos carbohidratos poseen unidades manosa-manosa α (1-3), α (1-6) o α (1-2), ácido siálico α (2-6) o α (2-3) galactosa, galactosa β (1-3) n-acetil galactosamina, galactosa β (1-4) n-acetil glucosamina.

Por otra parte, el análisis cromatográfico de fimbrias-adhesinas, así como de las subunidades protéicas que la componen demuestra que las fimbrias se mantienen en suspensión en soluciones acuosas y que las subunidades se reorganizan rápidamente para formar unidades de fimbrias y/o agregados de las mismas de alto peso molecular y que se disgregan de nuevo en subunidades de 14-20 kDa en presencia de soluciones alcalinas, detergentes aniónicos, o 2- β - mercaptoetanol, y sometidas a altas temperaturas (baño a 100°C).

Es también de destacar que, tanto las fimbrias tipo 1 como las tipo P purificadas poseen las mismas características que las definen cuando están unidas al cuerpo bacteriano, hemaglutinación y aglutinación de *S. cerevisiae* (tipo 1) [(3) y (15) Domingue GJ, Roberts JA, Lauciria R. Pathogenic significance of P. fimbriated *E. coli* in urinary tract infections. *J. Urology* 1985; 133:983-989] y técnica PPA, aglutinación de partículas "receptorespecífica" [(16) Svenson SB, Källénus G, Möllby R, Huttberg H, Winberg J.

Rapid identification of P. fimbriated E.coli by a receptor-specific particle agglutination test. Infection 1982; 10:209-213].

Las fimbrias-adhesinas intactas obtenidas por el procedimiento de la presente invención a partir de cepas de E. coli con fimbrias de tipo 1 (CECT 4485) y de tipo P(CECT 4484), aisladas de orinas de mujeres con cistitis recidivantes, tienen importantes aplicaciones como inmunógenos y constituyen el producto utilizado en esta invención como inmunizante para obtener anticuerpos poli o monoclonales.

La capacidad inmunógena de las fimbrias-adhesinas hace posible la producción de anticuerpos específicos anti-fimbrias-adhesinas de tipo 1 y anti-fimbrias-adhesinas de tipo P, tanto poli como monoclonales, que por otra parte poseen prácticamente nula reactividad cruzada. Dichos anticuerpos pueden utilizarse como herramientas diagnósticas para tipificar el tipo de fimbrias-adhesinas de E. coli uropatógenos. Por otra parte, la utilización de las fimbrias-adhesinas intactas como agentes protectores contra la ITU se muestra eficaz durante la inmunización activa con dichos componentes. Los productos que, en concreto, se han utilizado terapéuticamente en la prevención de infecciones del tracto urinario producidos por E. coli uropatógenas son: (1) las fimbrias intactas en suspensión acuosa, (2) las fimbrias con adjuvantes, bien adsorbidas a gel de hidróxido de aluminio, bien unidas covalentemente a polisacáridos de alto peso molecular [como por ejemplo el pululano que es un polímero lineal de glucosa (maltotriosa) producido por Aureobosidium pullulans] y (3) en nanopartículas por vía oral.

Los estudios experimentales de inducción de la respuesta inmune específica contra las fimbrias intactas demostraron efectividad en la respuesta inmune humoral con producción de anticuerpos específicos, así como la inducción temprana de la respuesta inmune natural y celular comprobada mediante estudios histopatológicos. La presencia de infiltrados inflamatorios con acúmulo de glóbulos blancos (macrófagos y linfocitos) hace pensar en el inicio de la respuesta inmune-celular específica subsiguiente a la infección del tracto urinario.

De la misma manera, la inmunización con fimbrias de tipo 1 y de tipo P previa a la ITU en ratones, provoca unas diferencias significativas entre grupos infectados experimentalmente, según hayan sido previamente inmunizados o no, con lo que puede concluirse que este tipo de inmunización activa provoca una protección específica en la ITU provocada por cepas de E. coli uropatógenas.

Los anticuerpos específicos (anti-fimbrias) policlonales obtenidos en ratón son capaces de inhibir la capacidad de adhesión de las fimbrias-adhesinas tipo 1 y tipo P.

Los inmunógenos (fimbrias) intactas o con adjuvantes se administran en forma de suspensiones acuosas (solución salina tamponada con mertiolato al 0,01%) que han mostrado efectividad en un rango amplio de dosis 0,1 μ g -100 μ g/kg de peso, administradas en 1 a 4 dosis, espaciadas en el tiempo con un mínimo de 30 días (siempre que se administre más de una dosis). Los adjuvantes utilizados normalmente son gel de hidróxido de aluminio, gel de fosfato cálcico y pululano.

Las vías de administración de los inmunógenos son normalmente la subcutánea y la intraperitoneal.

De cualquier manera, no se pueden excluir otras vías y formas de administración como la oral, en cápsulas o micropartículas, así como la vía intrauretral en forma de suspensión.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

Ejemplo

Cepas y características de las mismas.

Se aislaron diferentes cepas de E. coli a partir del tracto urinario de mujeres con cistitis recidivantes, que se tipificaron en cuanto a posesión de fimbrias mediante técnicas de aglutinación en presencia o no de manosa, capacidad de adhesión a células uroepiteliales humanas, características de los serotipos presentes mediante inmunosueros específicos y producción de hemolisina detectable en cultivos de agar sangre. Finalmente, se seleccionaron las siguientes cepas:

Cepa	Serotipo	Tipo fimbria	Adherencia	Hemolisina
IA1P10	07:K1	1 y P	89 bact/cél.	-
IA1P2H	06:K2	1 y P	> 100 bact/cél.	+
CECT 4485	05:K13	1	> 100 bact/cél.	+
IA1OH	083:K-	1	> 100 bact/cél.	-
CECT 4484	04:K-	P	> 100 bact/cél.	+
IAX130	025:K13	X	57 bact/cél.	+

Método de obtención y caracterización.

Se sembraron cepas de *E. coli* uropatógenas en caldo nutritivo y se incubaron toda la noche a 37°C. 1 ml de estos cultivos (10^8 - 10^9 ufc/ml) se sembró en 500 ml de caldo nutritivo, y se realizó una incubación de 37°C durante toda la noche, sin agitar. Los cultivos ya crecidos, se centrifugaron a 10.000-20.000 x g durante 20 minutos, por tres veces, con objeto de eliminar el medio de cultivo, y el precipitado se resuspendió en solución salina estéril (SS) (45 ml/500 ml cultivo). Las bacterias en SS fueron homogeneizadas en frío (4°C) en un homogeneizador mecánico de aspas (cuchillas), con 4 pulsos de 1 minuto a 18.750 rpm con intervalos de 3 minutos entre diferentes pulsos. (Homogeneizador Virtishear-25 con ensamblador y cuchillas macro). El material homogeneizado (bacterias y fimbrias separadas de las bacterias) se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos en frío. Se recuperó el sobrenadante conteniendo las fimbrias que se purificaron por precipitación salina; realizada con $MgCl_2$ (20,3 g de $MgCl_2 \cdot 3H_2O$ /litro de sobrenadante) en frío. El material precipitado se recuperó por centrifugación (20.000 x g, 30 minutos a 4°C) que se resuspendió en PBS 0,02 M pH=7,4. La precipitación salina se repitió 3 veces. El material (fimbrias), resuspendido en PBS después de la última precipitación, se dializó en tubos de diálisis, exhaustivamente contra agua destilada.

Las fimbrias así aisladas se trataron con desoxicolato sódico al 5% a una temperatura de 80°C durante 15 minutos, y se dializaron nuevamente contra agua destilada.

Las muestras se pasaron por una columna (XK26/100 Pharmacia) de Sephacryl S-200 HR y se monitorizaron en un equipo ISCO VA-5 con un colector de fracciones Retriever II. Se utilizó tampón de elución Tris-HCl 50mM pH=8,0 a un flujo de 40 ml/h. Se recopilaron las fracciones correspondientes al volumen de elución y éstas se pasaron por una columna de las mismas características y en las mismas condiciones, pero con gel de Sepharosa 4B.

El material que se recogió fue el volumen de inclusión. Dicho material se dializó exhaustivamente contra agua destilada y constituyó la base para todas las experiencias posteriores.

La cuantificación de azúcares (11) (método de reducción de azúcares para la cuantificación de monosacáridos por el reactivo de la neocuproina) y de proteínas (4) (medida espectrofotométrica a una $\lambda = 280$ nm con patrones de seroalbúmina bovina) con muestras de fimbrias disgregadas por calor y SDS permitieron estudiar el rendimiento del proceso de obtención de fimbrias que fue de 3-10 mg de proteínas fimbriales por litro de cultivo y de 0,03 - 0,5 mg de azúcares monosacáridos por litro de medio de cultivo.

El tratamiento de las fimbrias en base al método de Mc Michael y cols (13) permitió evaluar los componentes protéicos de dichas fimbrias (acidificación de la muestra a pH = 2, calentamiento 10 minutos a 100°C, alcalinización de la muestra a pH = 10. Centrifugación y recuperación del sobrenadante que se neutralizó a pH = 7. Se realizaron precipitaciones con sulfato de amonio y se recogió el precipitado que se resuspendió en tampón de muestra Tris-HCl 0,5 M pH = 6,8, SDS 10% -con y sin 2- β - mercaptoetanol. Las muestras se calentaron a 100°C durante 2 minutos ó 10 minutos.

La electroforesis en sistema discontinuo SDS-PAGE al 12,5%, se realizó en base al método de Laemmli [(17) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 1970; 277:680-685].

Los resultados mostraron una banda principal correspondiente a más del 95% del total de proteínas fimbriales, tanto para las proteínas de las fimbrias tipo 1 (19 kDa) como para las de tipo P (18 kDa), con patrones poco diferenciables entre los dos tipos de fimbrias, cuando dichas muestras se calentaron

durante 2 minutos.

Cuando las muestras se someten a calentamientos más prolongados (10 minutos), el patrón electroforético de ambos tipos de fimbrias difiere ostensiblemente. Así, las fimbrias del tipo 1 muestran 5 fracciones diferentes con peso molecular entre 21 y 13 kDa con dos bandas mayoritarias 33% y 31% de 19 a 15 kDa.

Las fimbrias de tipo P muestran 5 bandas comprendidas entre 20 y 14 kDa con un componente principal 53% de 18 kDa.

La detección y diferenciación de glicoproteínas asociadas a las bandas de pilina (11) reveladas mediante inmunodetección de lectinas por el método diseñado por Boehringer Mannheim (Glycan Detection Kit y Glycan Differentiation Kit), en fracciones fijadas a membranas de nitrocelulosa demostró la presencia de azúcares asociados a las bandas de pilina en ambos tipos de fimbrias. Las lectinas utilizadas reconocieron residuos manosa terminal $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ ó $\alpha(1-2)$, unidos a manosa, ácido siálico unido a $\alpha(2-3)$ galactosa y galactosa $\beta(1-3)$ N-acetilgalactosamina. Dicho reconocimiento puede ser, tanto a nivel terminal como a nivel medio, dado el tratamiento previo a que se somete la muestra.

La presencia o no de 2- β -mercaptoetanol (2-*beta* BE) determina la modificación en la movilidad de las fracciones 19 kDa y 18 kDa de las fimbrias tipo 1 y P respectivamente. La presencia de 2- β -ME disminuye la movilidad electroforética. Esto indica que las subunidades que aparecen forman parte de las fimbrias (13). El análisis espectrofotómetro a longitudes de onda comprendidas en el rango ultravioleta muestran la presencia de un máximo relativo a 290 nm en las fimbrias aisladas directamente del proceso de obtención y que desaparece tras el tratamiento de las mismas con agentes disgregantes que caracterizan la integridad o grado de polimerización de las fimbrias.

El análisis mediante microcromatografía de alta resolución por el sistema SMART (Pharmacia Biotech) con microcolumnas de filtración en gel Superdex 75 Pc 3.2/30) según metodología propuesta por la casa manufacturadora demuestra la característica agregante de las subunidades de pilina en medios acuosos. Subunidades de pilina disgregadas con choques ácido-básicos, 2- β -mercaptoetanol, SDS, urea y/o calor, vuelven a reagruparse rápidamente en medio acuoso una vez retirados los agentes disgregantes, volviéndose a recuperar las muestras en el volumen de exclusión de la microcromatografía, indicando tal como apuntan otros autores (13) el carácter hidrofóbico de estas proteínas.

Los estudios de microscopía electrónica de transmisión muestran la presencia de fimbrias en las dos cepas de E coli estudiadas (CECT 4484 y CECT 4485). Las microfotografías de las fimbrias purificadas muestran un alto grado de pureza de las mismas (figuras 1 y 2).

Estudio experimental

Con el fin de estudiar un modelo que permitiese ver el grado de protección que podría obtenerse a través de la inmunización activa de animales con fimbrias, se diseñó un estudio experimental en ratones Balb/c.

Se utilizaron 4 lotes de 20 ratones (cada lote) Balb/c, hembras, tal como se expresa en el protocolo.

La evaluación del estudio se realizó: (I) mediante técnicas de DOT-ELISA, tal como se describe en Bjerrum et al [(18) Gordon J, Billing P. Dot-Immunoblotting. General principles and procedures. En Bjerrum OJ and Heegaard NH. Eds. Handbook of Immunoblotting of proteins. Vol. I. CRC Press 1988.pp: 27-30] para medir el nivel de anticuerpos (título) específicos a partir de suero y orina; (II) mediante aislamiento (6) e identificación (Sistema API) de las bacterias a partir de las piezas necrópsicas. La tipificación del tipo de fimbrias de las bacterias E. coli aisladas se efectuó mediante SDS-PAGE de las fimbrias obtenidas de cada aislamiento de E. coli; (III) mediante estudios histopatológicos [(19) Bancroft JB, Stevens A (ed). Theory and Practice of Histological Techniques. 1.982; 2nd Edition. Churchill and Livingstone. Edimbourg] de las piezas necrópsicas (riñones y vejiga).

ES 2 076 895 B1

Protocolo del estudio experimental:

Lote N°	Individuos	Raza	Definición del lote	Características	Muestras estudiadas
1	10 Hembras	BALB/c	Control de sanos	Ratones sanos no inmunizados, no infectados	Suero, vejiga y riñones
2	20 Hembras	BALB/c	Infección con E. Coli IA 1 13 H	Ratones sanos no inmunizados, infectados con E. Coli CECT 4485	Suero postinfección, orina pre y postinfección vejiga y riñones
3	20 Hembras	BALB/c	Infección con E. Coli IA P O H	Ratones sanos inmunizados, infectados con E. Coli CECT 4484	No suero postinfección, orina pre y postinfección vejiga y riñones
4	20 Hembras	BALB/c	Inmunización e infección	Ratones sanos inmunizados con fimbria 1 mas fimbria P y después infectados con ambas cepas (1:1)	Suero postinmunización y postinfección, orina pre y postinfección, vejiga y riñones
7	10 Hembras	BALB/c	Ratones inmunizados no infectados	Ratones sanos inmunizados con fimbria 1 mas fimbria P	Orina pre y postinmunización, sangre días 0, 15 y 30, vejiga y riñones

ES 2 076 895 B1

Modelo de infección

* N° Lotes : 4

* Tamaño e Identificación Lotes :

Lote testigo sanos : Lote N° 1. No infectados/no inmunizados. 10 animales.

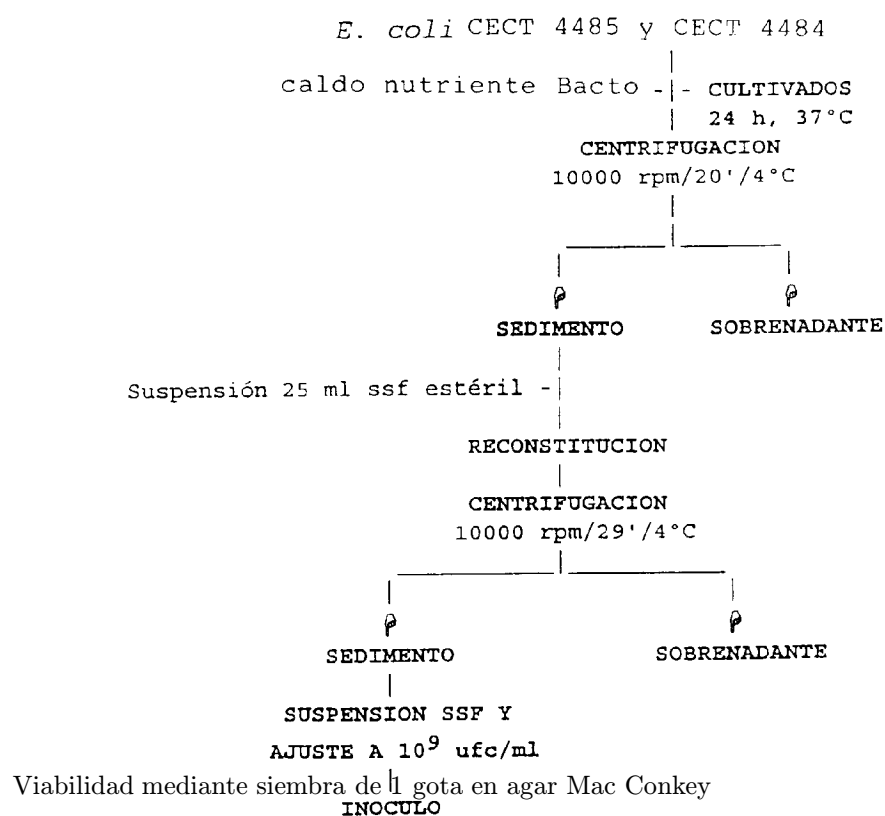
Lote control infectado : Lote N° 2. Infectado con E. coli CECT 4485 20 animales.

Lote control infectado : Lote N° 3. Infectado con E. coli CECT 4484 20 animales.

* Catéteres : Acero inoxidable 0,5 mm diámetro estériles.

* Anestesia : 0,15 - 0,20 ml, vía i.m. "Zoletil 20" (Tiletamina + Zolazepam) 4 mg/ml.

* Inoculo :



ES 2 076 895 B1

Modelo de inmunización

5	Animales	:	Ratones BALB-c hembras	Jaulas : 5 animales
			Edad : 8 - 10 semanas	
			Peso Medio : 20 g	
	Identificación	:	Digitalizada : Lote/Jaula/Nº Ratón	
10			Ejemplo : Código L2J3R5	
			- Lote Nº 2	
			- Jaula Nº 3	
			- Ratón Nº 5	
15	Modelo de inmunización	:		
	*Nº Lotes	:	2	
20	*Tamaño e Identificación Lotes	:		
	Lote control - lote nº 7	:	Ratones inmunizados con Fimbrias 1 y P. 10 animales.	
	Lote prueba - lote nº 4	:	Ratones inmunizados con Fimbrias 1 y P e infectados con serotipos CECT 4485 y CECT 4484 20 animales.	
25	*Vía de Administración	:	SC en adyuvante completo Freund.	
30	*Dosis Administración	:	25 mcg Fimbrias tipo 1	4 Dosis
			25 mcg Fimbrias tipo p	semanales

Controles Modelo Animal Inmunización-Infección

5	* Control Urinario :	Descarte de ratones con urocultivo positivo a partir de muestras orina de micción espontánea. <i>Medio Urocultivo</i> : Mac Conkey y Nutrient agar.
10	* Infección :	Cateterización a través de meato urinario e inyección intravesical media de 0,1 ml de una suspensión de bacterias ajustada a 10^9 ufc/ml.
15	* Necropsia :	Sacrificio : 72 h post-infección vesical. Sangría : Punción del ángulo interno del ojo con pipetas Pasteur en animal anestesiado y transvase a tubos Eppendorf para retracción del coágulo y obtención de suero.
20		Muestras : Incisión mediana desde pelvis a base del cuello, prolongada sobre las patas, previa desinfección de la piel con etanol. Incisión adicional mediana, para apertura y acceso a la cavidad abdominal.
25		Obtención orina estéril: Punción vejiga con aguja de 0,5 mm diámetro y aspiración en jeringa de 1 ml, para su posterior cultivo e identificación de anticuerpos.
30		Obtención vejigas : Tras vaciado de orina, se seccionó y extrajo la vejiga por su base, trasladándose a un vial con formol tamponado para estudio histopatológico.
35		Obtención riñones: Disección y extirpación de ambos riñones y corte sagital de los mismos a nivel de pelvis renal en dos partes iguales. Análisis microbiológico por frotis de la superficie del corte sobre placas con agar Mac Conkey e incubación 37°C/24 h. Análisis histopatológico.
40		
45		
50		
55		
60		

Resultados Globales del Estudio de Infección Experimental en los Diferentes Lotes de Ratones.

Cepa y N° lote	Total animales Inoculados	Total animales Inmunizados	Total animales Infectados (%)
CECT 4485 (Lote 2)	20	0	16 (80)
CECT 4484 (Lote 3)	20	0	8(40)
CECT 4485 (Lote 4)	20	20(FIMBRIA 1)	7 (35)
CECT 4484 (Lote 4)	20	20(FIMBRIA P)	0 (0)

Los estudios histopatológicos demostraron que la inoculación de los ratones hembras por vía uretral producía pielitis, uretritis o cistitis aguda.

En todos los casos, los fenómenos inflamatorios se circunscriben al epitelio transicional de los cálices y el tejido conectivo subyace al mismo, y en menor medida, se aprecian fenómenos inflamatorios segmentarios de la porción proximal del ureter, no se encuentran focos de infección en el parénquima.

Estudio de la respuesta immune del ratón frente a la inmunización con antígenos fimbriales.

Se estudió la respuesta immune humoral, midiendo el título y características de los anticuerpos específicos, mediante técnica de DOT-ELISA, tal como describe Gordon et al. (18), ELISA en base a Muñoz y cols. [(20) Muñoz C, Nieto, A, Gaya A, Martínez J, Vives J. New experimental criteria for optimization of solid-phase antigen concentration and stability in ELISA. J Immunol Methods 1986; 94: 137-144] y SDS-PAGE Immunoblotting [(21) Towbin H, Staehelin I, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:4350-4354]

El estudio de reactividad cruzada entre fimbrias de tipo 1 y de tipo P se realizó mediante ELISA inhibición, según el método descrito por Martínez y cols. [(22) Martínez J, Nieto A, Vives J, Torres JM. Application of ELISA inhibition to Aspergillus antigen standardization for immunodiagnosis. J Med Vet Microbiol 1985; 23:317-320].

Los resultados mostraron un claro incremento del título de anticuerpos específicos que fueron desde valores negativos en todos los individuos, antes de ser inmunizados, hasta títulos (DOT-ELISA) de más de 1.280 y valores de diferencia de absorbancia (ELISA) de 1,5 a diluciones del suero de 1/1.000, tras tres inmunizaciones con intervalos quincenales.

El immunoblotting demostró la especificidad de la reacción de los anticuerpos mismos, frente a las fracciones de 17 kDa (tipo 1) y de 19 kDa (tipo P), correspondientes a los componentes fundamentales de las fimbrias.

El estudio de reactividad cruzada mediante ELISA no mostró reactividad cruzada de forma significativa.

Como puede observarse en los gráficos de las Figuras 3 y 4, entre fimbrias de tipo 1 (fase sólida) y de tipo P (fase inhibidora) no se pudo observar reactividad cruzada. Entre fimbrias de tipo P (fase sólida) y de tipo 1 (fase inhibidora) se detectó una muy escasa reactividad cruzada que fue inferior al 2% y con diferencias de Ag_{50} de ambos sistemas superiores a 5×10^3 .

ES 2 076 895 B1

Título de Anticueros de Sueros de Ratones de Estudio Experimental mediante DOT-ELISA.

5					Lote N°.7			Lote N°.4			
	Cepa	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 33
10	C E C T 4 4 8 4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	640	>1280	Negativo	> 1280	>1280	>1280
15											
20											
25	C E C T 4 4 8 5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	320	>1280	Negativo	640	>1280	>1280
30											

Lote control no infectado : Lote 1 : Sacrificado 72h. no título ACS. anti-fimbria

35 Lote infectado CECT 4485 : Lote 2 : Sacrificado 72h. no título ACS. anti-fimbria

Lote infectado CECT 4484 : Lote 3 : Sacrificado 72h. no título ACS. anti-fimbria

40 Lote inmunizado con fimbrias tipo 1 y P : Lote 7 : título positivo día 15

Lote inmunizado con fimbrias tipo 1 y P : Lote 4 : título positivo día 15

45

50

55

60

ES 2 076 895 B1

Niveles de IgA Específica en Orina de Ratones de Estudio Experimental mediante DOT-ELISA.

Cepa	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote N°. 4		Lote N°. 7	
				Preinfeccion	Postinfeccion	Preinmunizacion	Postinmunizacion
CECT 4484	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CECT 4485	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

El análisis estadístico expuesto en el cuadro anterior (titulado “Resultados globales del estudio de infección experimental en los diferentes lotes de ratones”), demostró la existencia de diferencias significativas entre el lote control sin infectar, los lotes infectados y los inmunizados previamente a la infección.

Ensayo de toxicidad

Se realizaron ensayos de toxicidad anormal en cobayo (vía intraperitoneal), tolerancia local por vía subcutánea en rata y toxicidad anormal en ratón (vía intraperitoneal), según protocolos estándar y realizados por el Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado, S.A.L. (homologado).

Los resultados no mostraron ningún elemento que entrase en conflicto con la normativa de la Farmacopea Europea, para incluirlo como producto no aceptable.

REIVINDICACIONES

1. Fimbrias-adhesinas de tipo 1 y P aisladas de las nuevas cepas de E. coli CECT 4484 y CECT 4485, **caracterizadas** por tener un peso molecular comprendido entre 2×10^5 y 2×10^7 Da y por estar constituidas por un 90-95% en peso de proteína y el 1-3% en peso de azúcares, mostrando las fimbrias de tipo 1 la presencia de 5 fracciones protéicas diferentes con pesos moleculares comprendidos entre 14 y 20 kDa, de las cuales existe un componente mayoritario (55%) de 17-18 kDa que está asociado a carbohidratos y mostrando las fimbrias de tipo P la presencia también de 5 fracciones protéicas con pesos moleculares comprendidos entre 14 y 20 kDa de las cuales dos son mayoritarias (35% y 30%) de 19-20 kDa y 15 kDa respectivamente, de los cuales el primero está asociado a carbohidratos, conteniendo los mencionados carbohidratos unidades manosa-manosa $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ ó $\alpha(1-2)$, ácido sialico $\alpha(2-6)$ ó $\alpha(2-3)$ galactosa, galactosa $\beta(1-3)$ n-acetil galactosamina, galactosa $\beta(1-4)$ n-acetil glucosamina.

2. Procedimiento de obtención de las fimbrias-adhesinas definidas en la reivindicación 1 anterior, **caracterizado** porque comprende las siguientes operaciones:

- a) sembrar bacterias de las cepas CECT 4484 y CECT 4485 de E. coli en un medio de cultivo líquido a 37°C aproximadamente hasta obtenerse cultivos en el inicio de la fase estacionaria (10^8 - 10^9 ucf/ml);
- b) centrifugar los cultivos y lavar el sedimento obtenido;
- c) resuspender los sedimentos lavados en una solución salina fisiológica de pH neutro y homogeneizar, en frío, en un homogeneizador de aspas durante 2 a 10 minutos, a una velocidad de 10.000 a 25.000 rpm;
- d) centrifugar los homogeneizados así obtenidos a unos 25.000-45.000 x g durante 20-45 minutos, descartar el sedimento conteniendo las bacterias y recuperar el líquido sobrenadante;
- e) someter el líquido sobrenadante conteniendo las fimbrias a varias precipitaciones salinas en frío durante un período de tiempo comprendido entre 2 y 15 horas, recuperándose el precipitado mediante centrifugación;
- f) reconstituir el precipitado así obtenido en una solución acuosa fisiológica de pH neutro y dializar la solución obtenida;
- g) tratar la solución dializada conteniendo las fimbrias con desoxicolato sódico al 5% a 80°C aproximadamente;
- h) cromatografiar el producto resultante de la etapa anterior en una columna de filtración en gel conteniendo Sephacryl S-200 y someter el producto cromatografiado (volumen exclusión) a otra cromatografía en columna conteniendo Sepharosa 4B (volumen inclusión), para obtener las fimbrias deseadas.

3. Aplicación de las fimbrias-adhesinas definidas en la reivindicación 1, para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario producidas por E. coli fimbriadas.

4. Aplicación de las fimbrias-adhesinas definidas en la reivindicación 1 para la fabricación de vacunas para la prevención de las infecciones del tracto urinario producidas por E. coli fimbriadas.

5. Aplicación de las fimbrias-adhesinas definidas en la reivindicación 1, para la fabricación de anticuerpos anti-fimbria-adhesina del tipo 1 y P aisladas de las cepas de E. coli CECT 4484 y CECT 4485.



FIGURA 1



FIGURA 2

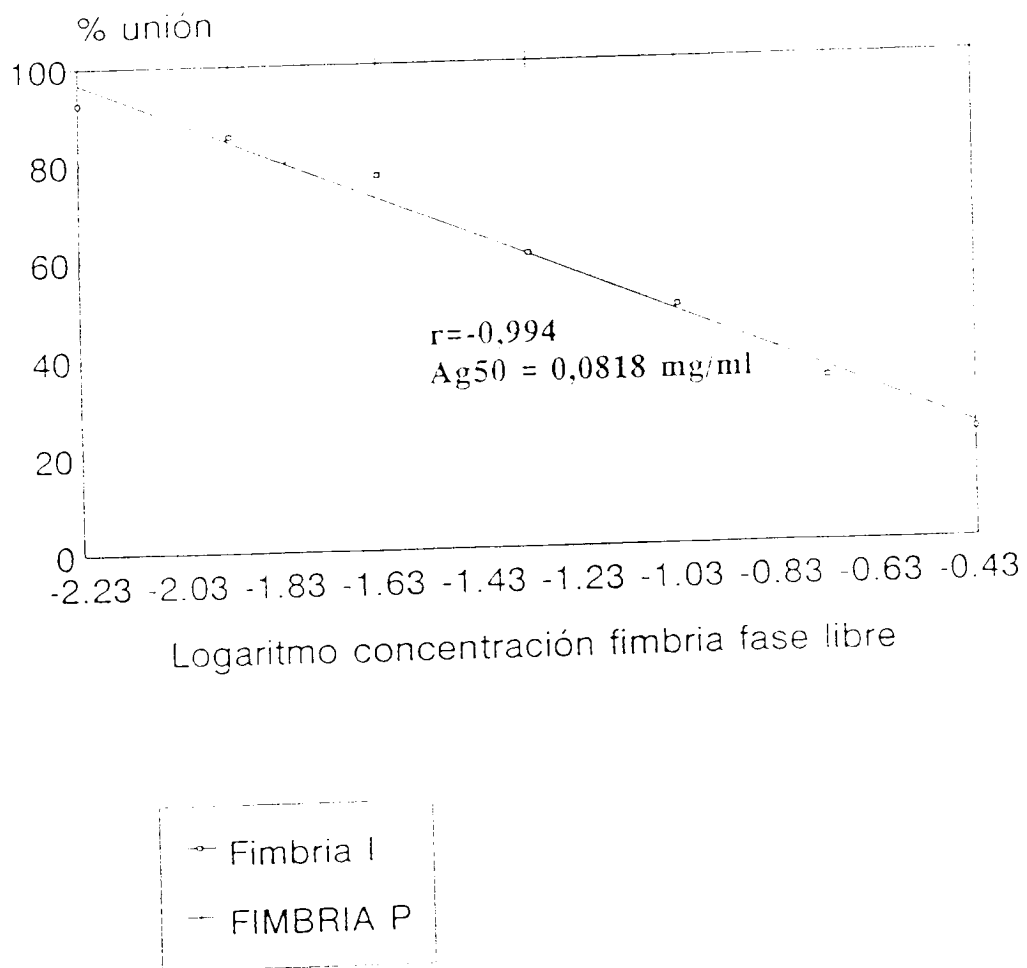


FIGURA 3

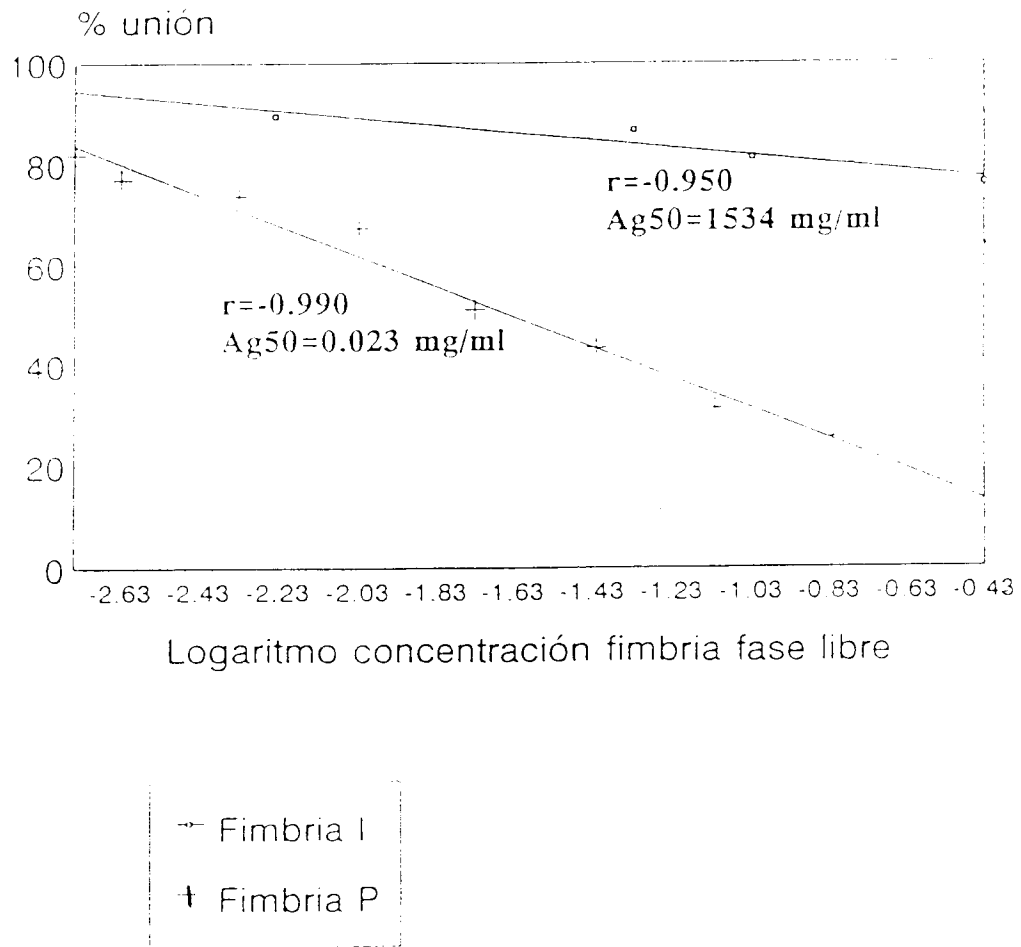


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 076 895
⑫ N.º solicitud: 9400202
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 04.02.94
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C07K 14/245, 1/36, 16/12, A61K 39/108

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP-249739-A (BACTEX INCORPORATED) 23.12.87	
A	EP-102831-A (UNILEVER NV) 14.03.84	
A	WO-8604604-A (SLAGTERIERNES FORKNINGSINSTITUT) 14.08.86	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 29.09.95	Examinador J. López Nieto	Página 1/1
--	------------------------------	---------------