

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 836**

51 Int. Cl.:
C07K 14/245 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)
A61K 9/72 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06824210 .6**
96 Fecha de presentación: **26.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1947110**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Vacuna intranasal para uso contra la enfermedad ocasionada por Escherichia coli enterotoxigénica**

30 Prioridad:
08.11.2005 MX PA05011997

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (100.0%)
TORRE DE RECTORÍA, 9º PISO CIUDAD UNIVERSITARIA
MEXICO, DF 04510, MX**

72 Inventor/es:
**LÓPEZ VIDAL, YOLANDA;
SUASTE VILLANUEVA, OLGA ROXANA;
GODÍNEZ MORENO, RICARD y
ARREDONDO HERNÁNDEZ, LUIS JOSÉ**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 391 836 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

Vacuna intranasal para uso contra la enfermedad ocasionada por *Escherichia coli* enterotoxigénica

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con péptidos con fines vacunales, específicamente se relaciona con péptidos que inducen respuesta inmune en mucosas y más específicamente se relaciona con un péptido incluido en una composición vacunal intranasal para generar respuesta inmune protectora en mamíferos contra la enfermedad ocasionada por *Escherichia coli* enterotoxigénica

Antecedentes de la invención

10 En la actualidad se estima que en el ámbito mundial se presentan más de 1,500 millones de episodios de diarrea por año, de los cuales, 3 millones terminan en muerte. Del total de episodios de diarrea; 210 millones son ocasionados por la bacteria *Escherichia coli* enterotoxigénica, de aquí en adelante denominada como ETEC por sus siglas en inglés, de estos episodios 380,000 casos terminan en defunciones (World Health Organization (WHO) State of the art of new vaccines Research & Development Initiative for Vaccine Research; Geneva, April 2003). Aunque la diarrea ocasionada por este microorganismo ocurre en todos los grupos etarios, la mortalidad es más común en niños
15 menores de 5 años, particularmente cuando esta enfermedad es concomitante con desnutrición, por lo que se ven especialmente afectados los países en desarrollo. Esta bacteria también es el principal agente causal de la denominada diarrea del viajero.

20 La infección por ETEC se adquiere por vía oral, principalmente por bebidas o alimentos contaminados; la bacteria supera las condiciones de acidez del estómago hasta llegar al intestino delgado, donde, debido a sus factores antigénicos de colonización denominados como CFA's por sus siglas en inglés, se adhiere a la mucosa y libera sus enterotoxinas que son principalmente dos, termolábil denominada LT y termoestable o ST que son las causantes de la diarrea (Gaastra W, Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in Microbiology*. 1996; 4(11): 444-452).

25 En la literatura están descritos más de 20 diferentes CFA's de los cuales se han identificado tres como los más prevalentes, y son denominados como CFA/I, CFA/II y CFA/IV que fueron reportados por diversos autores, ya que se detectaron entre el 50 al 75% de las cepas de ETEC aisladas de pacientes con episodios de diarrea alrededor del mundo, incluyendo México, la mayoría se encuentran agrupados en la familia CFA/I. (Gaastra W, Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in Microbiology*. 1996; 4(11): 444-452. López-Vidal Y, Calva JJ, Trujillo A, Ponce de León A, Ramos A, Svennerholm A-M, Ruiz-Palacios GM. Enterotoxins and adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli* are they a risk factor for acute diarrhea in the community? *J Infect Dis* 1990; 162:442-447. y Steinsland H, Valentiner-Branth P, Gjessing HK, Aaby P, Molbak K, Sommerfelt H. Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*: Longitudinal study. *The Lancet*. 2003; 362) Estos tipos de CFA inducen inmunidad protectora contra la bacteria y son señalados como los más importantes dentro de las estrategias para el desarrollo de vacunas efectivas. (Middlebrook JL, Dorland RB. Bacterial Toxins: Cellular mechanisms of Action. *Microbiological Reviews*. 1984; 48(3): 199-221. McConell MM, Hibberd ML, Penny ME, Scotland SM, Cheasty T, Rowe B. Surveys of human enterotoxigenic *Escherichia coli* from three different geographical areas for possible colonization factors. *Epidemiol. Infect.* 1991; 106: 477-484)

40 Debido a la importancia epidemiológica de ETEC, muchos de los esfuerzos se han encaminado hacia la prevención de la enfermedad mediante la obtención de una vacuna eficaz y segura, (Levine MM, Kaper JB, Black RE, Clements AM. New Knowledge on Pathogenesis of Bacterial Enteric Infections as Applied to Vaccine Development. *Microbiological Reviews*. 1983; 47(4):510-550) sin embargo, a la fecha estos esfuerzos han sido infructuosos y no se ha podido colocar en el mercado un producto que satisfaga estas necesidades. (World Health Organization [WHO] State of the art of new vaccines Research & Development Initiative for Vaccine Research; Geneva, April 2003)

45 Una de las vacunas que están en desarrollo y que ha alcanzado la fase de pruebas en voluntarios humanos sanos de diferentes regiones geográficas, fue elaborada en la Universidad de Gutemburgo en Suecia, y está basada en la subunidad B de la toxina de cólera combinada con 5 cepas formalinizadas de ETEC, que en su conjunto expresan los CFA's de mayor importancia epidemiológica a nivel mundial. (Quadri F, Ahmed T, Ahmed F, Sack B, Sack A, Svennerholm AM. Safety and Immunogenicity of an oral, inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera Toxin B subunit vaccine in Bangladeshi children 18-36 months of age. *Vaccine* 2003;21:2394-2403)

50 Otras estrategias para el desarrollo de vacunas se han encaminado a la utilización de bacterias vivas, como se ve en el trabajo realizado en el Centro para Desarrollo de Vacunas CVD de la Universidad de Maryland, utilizando como vector a *Shigella* para la expresión de factores de colonización y enterotoxinas de ETEC. (Barry EM, Altboum Z, Losonsky G, Levine MM. Immune responses elicited against multiple enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae and mutant LT expressed in attenuated *Shigella* vaccine strains. *Vaccine* 2003;21:333-340).

55 Recientemente se ha elaborado una vacuna con una nueva tecnología de administración; mediante un parche de inmunización transcutánea que contiene el componente de superficie de coli conocido como CS6 y la toxina termolábil conocida como LT; misma que ya ha sido probado en voluntarios humanos, donde se determinó una

respuesta inmunológica de tipo Th1 y Th2 caracterizada por IgG2a e IgG1 respectivamente, (Wenneras C, Firdausi Q, Prodeep KB, Bladley S and Svennerholm A-M. Intestinal Immune Responses in patients Infected with Enterotoxigenic *Escherichia coli* and in vaccinees. *Infect. Immun.* 1999; 66:3311-3316. Quadri F, Ahmed T, Ahmed F, Sack B, Sack A, Svennerholm AM. Safety and Immunogenicity of an oral, inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera Toxin B subunit vaccine in Bangladeshi children 18-36 months of age. *Vaccine.* 2003; 21: 2394-2403. Byrd, W., and F. J. Cassels. 2003. Mucosal immunization of BALB/c mice using enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors CFA/I and CS6 administered with and without a mutant heat-labile enterotoxin. *Vaccine* 21:1884-1893. Helander A, Wennerås C, Quadri F, Svennerholm AM. Antibody Responses in Humans against Coli Surface Antigen 6 of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity.* 1998; 66(9):4507-4510). Sin embargo la respuesta inmune contra los factores de colonización no fue consistente como lo muestra la prevalencia de la enfermedad en diferentes regiones geográficas.

Existen otro tipo de estrategias desarrolladas que incluyen vacunas formadas por factores de colonización encapsulados en microesferas, o mediante la expresión de la subunidad B de la LT en plantas de tabaco, papas, tomates y bananas, pero estas estrategias resultan ser demasiado costosas y aun así la protección conferida es baja.

Otra opción puede ser una vacuna elaborada con el epítipo linear común de secuencias inmunodominantes de los CFA que ofrezca mayor espectro e incremente el nivel de protección contra la infección por ETEC (López-Vidal Y, Epitopos continuos y comunes presentes en las fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). *Gac. Med. Mex.* 1997; 133 (6): 511-525. Domínguez M, et al. Colonization Factor Antigenic I Peptide as Intranasal Vaccine Approach against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in hamsters. 5th National Symposium, Basic Aspects of vaccines, 1999).

En términos generales podemos referir que se han evaluado diferentes tipos de vacunas contra la diarrea ocasionada por ETEC y aunque muchas de estas vacunas han demostrado efectividad protectora en contra de la infección por ETEC, algunas muestran ciertos efectos secundarios; otro problema importante a considerar en el diseño de vacunas en contra de ETEC es la variabilidad en la prevalencia de los diferentes factores de colonización, lo cual nos obliga a diseñar una vacuna que sea eficaz y segura frente a los diferentes serotipos de ETEC.

La administración intranasal puede ser una alternativa adicional para una vacuna contra ETEC, que agregaría ventajas adicionales, dando superioridad con otras vacunas. A este respecto se han realizado gran cantidad de trabajos que demostraron que el tejido linfoide asociado a mucosas denominado MALT por sus siglas en inglés, es un sistema común, es decir que la estimulación en un sitio determinado de la mucosas llamado también sitio inductor induce una respuesta a nivel local, a distancia o en el sitio efector, esto representó una gran ventaja en el diseño de vacunas, facilitándose principalmente la forma de administración por mucosas (Cripps AW, Kyd JM, Foxwell AR, Vaccines and Mucosal immunization. *Vaccine* 2001;19:2513-2515). El uso de la vía intranasal como vía de administración tiene como principales ventajas la presencia de una gran superficie altamente vascularizada, la eliminación del uso de jeringas con el riesgo que esto conlleva, la disminución de las dosis administradas en comparación con la vía oral lo que implica una disminución de efectos adversos, administración fácil, aplicación a un gran número de personas en tiempos relativamente cortos y la inducción de anticuerpos y células de la respuesta inmune (Zuercher AW. Upper Respiratory Tract Immunity. *Viral Immunology* 2003;3:279-289). Existen trabajos que demuestran que la administración por vía intranasal puede estimular la producción de IgA secretora a nivel intestinal lo que proporciona una gran ventaja en el desarrollo de vacunas dirigidas a la protección contra patógenos intestinales (Hong-Yin Wu, Russell MW. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 1998;16(2/3):286-292).

Las estrategias vacunales para mejorar la inmunidad al nivel de la mucosa incluyen el uso de estas rutas alternas junto con adyuvantes. (Colonization Factor Antigenic I Peptide as Intranasal Vaccine Approach against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in hamsters. Domínguez M, et al. 5th National Symposium, Basic Aspects of vaccines, 1999) Recientemente se ha utilizado la mucosa nasal como sitio inductivo que ha mostrado incrementar la respuesta inmune a nivel de la mucosa localmente y distalmente como la mucosa intestinal, respiratoria y genital. Administrar algún antígeno a la mucosa asociada con tejido linfoide es una manera de inducir respuesta inmune en sitios distales de mucosa. (Byrd, W, and F. J. Cassels. 2003. Mucosal immunization of BALB/c mice using enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors CFA/I and CS6 administered with and without a mutant heat-labile enterotoxin. *Vaccine* 21:1884-1893. Van Ginkel FW, Nguyen HH, McGhee JR, Vaccines for Mucosal Immunity to Combat Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases.* 2000; 6(2):123131.)

La Solicitud de Estados Unidos 2003/0161889 A1, describe una composición inmunoestimuladora basada en microesferas de un diámetro de 1 nm a 10 micrómetros con un antígeno encapsulado en un polímero biodegradable y bioecológico para prevenir infecciones intestinales, dichas microesferas incorporan el antígeno "pilus" AF/R1, incluyendo diversos péptidos de varias secuencias. Los ejemplos de la memoria descriptiva muestran ausencia de patología en los modelos animales de hámsteres sirios de oro y ratones Balb/c.

Usando *E. coli* H10407 (078:H-), Cassels identificó 8 epítipos que inducían anticuerpos capaces de reconocer, en su conjunto, diversos epítipos lineales, tales como CFA/I. (Cassels F., "Analysis of *Escherichia coli* Colonization Factor Antigen I Linear B-Cell Epitopes, as Determined by Primate Responses, following Protein Sequence

Verification", 1992, Infection and Immunity, Vol. 60, No. 6, páginas 2174-2181). Sin embargo, todos sus ensayos se realizaron en monos *Rhesus*. Las secuencias descritas comparten de hecho algunas regiones con la secuencia de la presente invención, pero el epítipo difiere ya que el método de obtención del epítipo de la presente invención es también diferente.

- 5 Es por lo anterior, que sigue siendo de gran relevancia contar con una vacuna efectiva contra la infección por ETEC que sea de aplicación mundial y por una vía de administración que permita una aplicación rápida, fácil y que los efectos adversos que se puedan generar sean reducidos al mínimo.

La presente invención se refiere a una vacuna peptídica que puede ser administrada por vía intranasal, conteniendo un epítipo proteico lineal común de los diferentes factores de colonización de ETEC reconocido por sueros de
10 pacientes infectados con la bacteria.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra de forma integrativa los resultados obtenidos posterior a la inmunización de los ratones con CLE, CTB o la vacuna y un grupo control que posteriormente fueron infectados con ETEC H10407; se muestra el porcentaje de excreción de ETEC: Donde – corresponde a negativo; + corresponde a 25%, ++ corresponde a 50%;
15 +++ corresponde a 75% y ++++ corresponde a 100%; y con respecto a la presencia de diarrea: 0 significa sin diarrea; 1 significa pérdida de la consistencia de las heces pero sin la cola mojada; 2 significa región peri anal y cola húmedas y 3 significa cola, patas y abdomen bajo mojados y con apariencia inactiva. En esta figura se aprecia que la vacuna desarrollada tiene la capacidad de disminuir la excreción bacteriana además de los signos de diarrea lo que es claro al tercer día después de la infección.

La figura 2 muestra de forma integrativa los resultados correspondientes a las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ de las células obtenidas del bazo y las placas de Peyer posterior a la inmunización de los ratones con CLE, CTB o la vacuna y un grupo control que posteriormente fueron infectados con ETEC H10407 donde se aprecia de forma general que el mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ fue obtenido por el grupo vacunado tanto en bazo como en placas de Peyer.

La figura 3 muestra una gráfica integrativa donde se analizó el porcentaje de células productoras de citocinas intracelulares de linfocitos específicos a la vacuna obtenidos del bazo, los ganglios linfáticos inguinales, los ganglios linfáticos cervicales y las placas de Peyer pertenecientes a los ratones inmunizados con CLE, CTB o la vacuna observándose que se produjeron principalmente las citocinas IL-4 e IL-10 en especial para los animales vacunados en todos los órganos de estudio, pero se observó también una escasa producción de INF-gamma.

La figura 4 muestra la evaluación de la infección por ETEC que expresa CFA/I en modelo de hámster sirio dorado después de la administración de la vacuna donde se aprecia que en los animales vacunados se disminuye tanto el porcentaje de hámsteres enfermos como la duración de la diarrea cuando se compara contra el grupo control, así también se aprecia que existe una disminución del tiempo de excreción de ETEC.

La figura 5 muestra los niveles de anticuerpos IgG contra CLE y CFA/I de ETEC de hámsteres vacunados y controles, 11 días después de la infección con ETEC CFA/I donde se aprecia que existe un incremento significativo en el título de anticuerpos IgG contra el CLE en los animales después de la vacunación.

La figura 6 muestra los títulos de anticuerpos contra CLE, CFA/I, CFA/II, CTB y LT en los hámsteres vacunados y controles 8 días después de la infección con ETEC y se aprecia claramente que después de la vacunación se generaron títulos altos de anticuerpos contra CLE, CFA/I, CFA/II, CTB y LT.

40 Descripción detallada de la invención

Para desarrollar esta vacuna primeramente se caracterizó la respuesta inmune que inducía el epítipo lineal común denominado como CLE asociado al adyuvante de mucosas, la subunidad B de la toxina del cólera denominado como CTB en modelo murino y en modelo de hámster sirio dorado. Partiendo de la fimbria CFA/I completa se identificó y se estudió un péptido de veinte aminoácidos nombrado CLE localizado en la secuencia lineal de la fimbria CFA/I de *Escherichia coli* entero toxigénica que va del aminoácido 33 al 52 identificada en la presente invención como SEQ ID 1, que contiene una cisteína terminal en la posición 53, incluida para formar complejos proteicos como son dímeros, trímeros y pentámeros predominando los trímeros a 37°C, para que tenga estabilidad en su configuración y se incremente su capacidad de facilitar su reconocimiento por el receptor clase II del complejo principal de histocompatibilidad y el receptor de linfocitos T o TcR. Este péptido es capaz de inducir respuesta inmunológica del tipo protectora contra los principales serotipos de ETEC.
50

La síntesis del CLE fue realizada por métodos convencionales. El CTB fue adquirido comercialmente del Laboratorio Merieux de Francia.

Para elucidar la secuencia del péptido CLE, se llevó a cabo la caracterización de epítopos lineales comunes para diferentes fimbrias de ETEC, mediante la síntesis de octapéptidos continuos que abarcaron la secuencia completa del factor antigénico de colonización I designado como CFA/I; por el método de Geysen en el que la síntesis de
55

péptidos se llevó a cabo en palillos de polietileno de forma que cada uno de ellos correspondía a uno de los pozos de una placa de ELISA. Esta configuración permitió el estudio del reconocimiento por anticuerpos contra sueros de niños menores de cinco años que habían padecido la infección por ETEC, sueros de adultos de zonas endémicas y no endémicas, sueros hiperinmunes que fueron preparados mediante la inmunización de conejos con cepas de ETEC portadoras de diferentes factores de colonización y suero monoclonal anti-CFA/II. El ensayo se realizó de forma similar a un ELISA. La mayoría de los sueros de los niños pertenecientes a la etapa convaleciente reconocieron todos los octapéptidos, siendo mayor el reconocimiento para tres de estos, mismos que fueron reconocidos por el suero de un adulto perteneciente a un área endémica. Mientras que, el anticuerpo monoclonal anti-CFA/II no identificó ningún péptido. El reconocimiento de los octapéptidos se denominó epítomos.

La identificación de epítomos continuos y comunes en CFA/II por sueros hiperinmunes heterólogos fue muy variable y dependía de cada uno de los sueros encontrándose que los factores de colonización con mayor similitud y que presentaron respuesta antigénica cruzada fueron CFA/II, los componentes de superficie de coli 1, 3 y 4 designados como CS1, CS3, CS4 y el factor putativo de colonización O166 o PCFO166 y en estos parte de la secuencia del epítomo lineal común CLE estuvo reconocida. El CLE fue seleccionado debido a que fue reconocido por el 100% de los sueros de niños después de la infección natural y por sueros de adultos de áreas endémicas para ETEC. A partir de este hallazgo en nuestro laboratorio se desarrolló la vacuna peptídica CLE de los factores de colonización con la subunidad B de la toxina del cólera CTB cuya administración fue la vía intranasal por las ventajas ya referidas.

Análisis de la estructura del CLE: SEQ ID 1

Dicroísmo circular : Una solución de 100 µg/mL del CLE en trifluoroetano fué utilizada para las lecturas utilizando una celda de cuarzo con 1 cm. de longitud de paso óptico. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro JASCO J-715. El espectro obtenido es el promedio de cinco lecturas.

El espectro de dicroísmo circular para el CLE en PBS a pH 7,4 y temperatura ambiente 20°C, sugiere la formación de una estructura secundaria. El espectro indica que el CLE del CFA posee una estructura predominante de lámina beta lo que concuerda con la predicción de la estructura secundaria realizada en el programa Antheptrot 5.0

Dispersión Dinámica de la Luz: Un mililitro del CLE 1mg/ml diluido en PBS 10 mM pH 7,4 se empleó para evaluar la dispersión dinámica de la luz a diferentes temperaturas que fueron de 5, 15, 25, 35 y 37 °C. Se determinó el diámetro hidrodinámico del CLE utilizando el Zed ziser nano series (Mc Malvern, USA). Se encontró que el CLE tiene la capacidad de formar estructuras triméricas a condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

Teniendo bien caracterizado el CLE y evaluada su capacidad de generar respuesta inmunológica protectora, se procedió a desarrollar una composición vacunal integrada con una relación tal en sus componentes, que permita potenciar el efecto protector del CLE, preferentemente en esta invención se utiliza en una proporción de 8 partes del CLE por una de un adyuvante adecuado para su uso en mucosas, para este caso se utilizó el adyuvante CTB en un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable para aplicación intranasal en una dosis farmacológicamente efectiva, sin que el uso de este adyuvante sea limitativo, simplemente se presenta como el seleccionado en esta modalidad de la invención. La proporción utilizada en esta composición vacunal podrá variar de acuerdo al adyuvante utilizado.

Ejemplos

Los ejemplos aquí referidos se presentan con la finalidad de facilitar la comprensión de la invención y de ninguna manera es limitativa a los mismos.

Ejemplo 1

Demostración de la capacidad del péptido CLE para generar respuesta inmunológica protectora contra ETEC.

Se aplicó el péptido CLE a ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad, libres de patógenos que fueron distribuidos al azar para la formación de grupos con cinco animales en cada uno de ellos. El péptido CLE correspondiente a la SEQ ID 1 se administró en una dosis farmacológicamente eficaz, que para este caso fue de 50 µg/mL en un volumen de 7,5 µL por ratón, por vía intranasal en tres ocasiones a los 0, 7 y 28 días. El grupo control fue suministrado con solución amortiguadora de fosfatos PBS de forma oral. El reto se realizó una semana después de la última inmunización para lo cual se les administró por vía gástrica un inóculo de 6×10^8 UFC de la cepa H10407 de ETEC.

Para evaluar la protección conferida se determinaron parámetros como la excreción de ETEC en heces mediante coprocultivo e identificación por la prueba de hemaglutinación en presencia de D-manosa, (López-Vidal Y. Colonization Factor antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (Monoclonal Antibodies and Methods for Epidemiological Studies).1990. Goteborg, Suecia. Tesis Doctoral) y la determinación de la presencia de signos de diarrea fue evaluada de acuerdo a la gravedad con la siguiente escala: 0 sin diarrea; 1 pérdida de la consistencia de las heces pero sin la cola mojada; 2 región perianal y cola húmedas y; 3 cola, patas y abdomen bajo mojados y con apariencia inactiva (Arredondo LJ, Zaragoza S, Domínguez M, Willms K, López-Vidal Y, Cravioto A. Desarrollo de

un nuevo Modelo Animal Experimental Hámster Sirio Dorado para el estudio de la infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). *Enf Infec Microbiol.* 1997; 17(2):43-46).

5 También se caracterizó la respuesta inmune obtenida para ambos grupos estudiados para lo cual las células del bazo, los ganglios linfáticos cervicales, los ganglios linfáticos inguinales y las placas de Peyer fueron obtenidas de los ratones el día 7 después del reto con ETEC H10407. Las suspensiones celulares ajustadas, obtenidas de cada órgano, fueron proliferadas en presencia de los antígenos del CLE.

Al término de la proliferación celular, las células fueron marcadas con anticuerpos para identificar marcadores de superficie tales como CD3, CD4 y CD8 y para la identificación de Citocinas intracelulares tales como IFN-gamma, IL-4 e IL-10. Una vez marcadas las células fueron analizadas por citometría de flujo.

10 Los resultados mostraron que en relación a la excreción de ETEC, se observó que al día 1, en ambos grupos de animales se presentaron coprocultivos positivos en el 100%, En el tercer día los coprocultivos positivos fueron del 75% para el grupo control y 50% en el grupo inmunizado con el péptido CLE. La presencia de diarrea en los ratones posterior a la infección con ETEC fue observada únicamente con un cambio de consistencia de las heces para los grupos control e inmunizado con CLE que continuó para el cuarto día en este último grupo pero a partir del quinto día, la consistencia en las heces fue normal en todos los ratones. Estos resultados pueden ser apreciados con mayor detalle en la figura 1 que resume el seguimiento de los ratones después de la infección con ETEC H10407.

20 En cuanto a la evaluación de la respuesta inmune se encontró que la respuesta de linfocitos T CD4+ y T CD8+ fue ligeramente superior para el grupo inmunizado con CLE en comparación con el grupo control y cabe destacar que el incremento de linfocitos T CD4+ fue cerca de 2 veces en placas de Peyer con respecto al grupo control como se aprecia en la figura 2.

En cuanto a la respuesta de citocinas se observó una producción predominante de IL-4 e IL-10 en el grupo inmunizado con el CLE observándose un incremento en la producción de IL-4 de cerca de 2.6 veces en ganglios linfáticos cervicales en el grupo inmunizado con el CLE con respecto al control y de 0.8 veces en la producción de IL-10 en el mismo órgano lo que se ilustra en la figura 3.

25 Ejemplo 2

Demostración de la capacidad de generar respuesta inmune contra ETEC con el adyuvante CTB.

Los ratones fueron inmunizados con CTB a razón de 6 µg/mL administrando en volumen de 7,5µL por vía intranasal y al grupo control se le administró solución amortiguadora de fosfatos por vía oral, siguiendo la misma metodología referida en el ejemplo 1.

30 Los resultados obtenidos son los siguientes en relación a la excreción de ETEC, se observó que al día 1, tanto el grupo control como el inmunizado con CTB presentaron coprocultivos positivos en el 100%. Al tercer día los coprocultivos positivos fueron del 75% para el grupo control y del 50% para el grupo inmunizado con CTB observándose una respuesta similar a la obtenida en los ratones inmunizados con CLE del ejemplo 1. De forma similar a lo observado para los ratones inmunizados con CLE, los inmunizados con el CTB presentaron inconsistencia de las heces al tercer día, pero después del cuarto día la consistencia en las heces fue normal en el grupo CTB y el grupo control como se aprecia con más detalle en la figura 1

40 Con esto se demostró que el CTB tiene la capacidad de conferir cierta protección en contra de la infección ocasionada por ETEC pero esta protección no es suficiente para contrarrestar los signos de la enfermedad en los ratones como lo es la inconsistencia de las heces. En cuanto a la respuesta inmune se observó que la subpoblación T CD4+ se incrementó 0.4 veces en bazo en el grupo inmunizado con CTB con respecto al control pero la subpoblación T CD8+ fue muy similar al grupo control en los órganos estudiados como puede observarse en la figura 2. El perfil de citocinas mostró un incremento preferencial de IL-4 observándose una diferencia de 2.7 veces en ganglios linfáticos cervicales y 1.1 veces en placas de Peyer con respecto al grupo control. Sin embargo se obtuvo una considerable respuesta de INF-gamma en ganglios linfáticos inguinales como se observa en la figura 3.

45 Esto nos demuestra que el CTB cuando es administrado por si solo a los ratones por vía intranasal induce un incremento de las células de la respuesta inmune y citocinas del tipo predominante Th1 como el IFN-gamma lo que estimula una respuesta inmune celular, y ya se ha descrito que la respuesta protectora contra la infección por ETEC es de tipo humoral.

Ejemplo 3

50 La vacuna desarrollada en la presente invención se utilizó conteniendo el péptido CLE identificado en la SEQ ID 1 en una proporción 8:1 del CLE:CTB aplicándose por vía intranasal en una dosis farmacológicamente eficaz, que en este caso se ajustó al peso de los animales de experimentación, quedando en 50 µg/mL adicionado con CTB a dosis de 6 µg/mL administrando un volumen de 7,5µL. Se siguió la misma metodología de los ejemplos 1 y 2.

55 Los resultados obtenidos fueron los siguientes; en relación a la excreción de ETEC, se observó que al día 1, tanto en el grupo control como el inmunizado con la vacuna se presentaron coprocultivos positivos en el 100%. Al tercer día

los coprocultivos positivos fueron del 75% para el grupo control y del 25% en el grupo inmunizado con la vacuna. La presencia de diarrea en los ratones posterior a la infección con ETEC fue observada únicamente con un cambio de consistencia de las heces para los grupos control, mismo evento que no se presentó en el grupo inmunizado con la vacuna como puede apreciarse en la figura 1.

5 Pudo determinarse que la vacuna desarrollada en la presente invención presenta un efecto sinérgico entre el péptido CLE y el adyuvante CTB para la protección conferida contra la diarrea ocasionada por ETEC. Con respecto al grupo control, el grupo inmunizado con la vacuna presentó un incremento de linfocitos T CD4+ de 0,5 veces en el bazo y 5,7 veces en las placas de Peyer. Este incremento se observó también para los linfocitos T CD8+ en el grupo
10 inmunizado con la vacuna con 0,1 veces mayor en el bazo y 1,8 veces mayor en las placas de Peyer; al compararse con el grupo control como se aprecia en la figura 2.

La producción de IL-4 mostró un incremento considerable para el grupo inmunizado con la vacuna principalmente en el bazo y los ganglios linfáticos inguinales de 1 y 2,8 veces mayor respectivamente en comparación con el grupo control. La respuesta en los ganglios linfáticos cervicales y las placas de Peyer para el grupo inmunizado con la vacuna mostró un aumento en la producción de IL-4 en comparación al grupo control de 2,1 y 0,2 veces mayor respectivamente.

15 En cuanto a la respuesta para IL-10, se observó un incremento de esta citocina en todos los grupos con respecto al control, aunque este incremento fue menor que el observado para IL-4. El grupo que mostró un mayor aumento fue el del ejemplo 3 inmunizado con la vacuna en comparación con el grupo control siendo de 19,5, 0,4, 8 y 6,8 veces más en el bazo, los ganglios linfáticos cervicales, los ganglios linfáticos inguinales y las placas de Peyer respectivamente. El mayor porcentaje de células productoras de IL-10 fue obtenido en los ganglios linfáticos
20 cervicales siendo de 8,1% mayor en el grupo inmunizado con la vacuna.

Finalmente aunque los porcentajes de células productoras de IFN-gamma fueron muy pobres en todos los órganos estudiados se observó un incremento en los ganglios linfáticos cervicales e inguinales con respecto al grupo control de 1,5 y 4,3 veces respectivamente. Tanto en el bazo como en las placas de Peyer no se observaron diferencias en la respuesta de IFN-gamma como se aprecia en la figura 3.

25 Estos resultados nos indican que la administración intranasal de la vacuna conteniendo el péptido CLE adicionada con CTB en una relación de 8:1 respectivamente en un vehículo farmacéuticamente aceptable tiene la capacidad de inducir una respuesta protectora de linfocitos T principalmente CD4+ en sitios de respuesta inmune como las placas de Peyer, lo que es de gran utilidad porque estas se localizan en el intestino delgado que es el sitio blanco de la infección por ETEC. Además la vacuna generó la producción de citocinas tales como IL-4 e IL-10 distintivas de una
30 respuesta de tipo Th2 estimulando una respuesta inmune de tipo humoral que es la principal defensa protectora contra la enfermedad ocasionada por ETEC.

De los resultados obtenidos de los ejemplos 1, 2 y 3 se puede concluir que la protección conferida por el CLE cuando es administrado por la vía intranasal en ratones se incrementa cuando se administra en una formulación que contiene un adyuvante, que en este caso es el adyuvante CTB de forma que existe un efecto sinérgico entre estos
35 dos componentes de la vacuna.

Ejemplo 4

Hámsteres sirio dorado hembras de 6-8 semanas fueron inmunizados intranasalmente con el péptido CLE correspondiente a la SEQ ID 1 a dosis de 50 µg/mL adicionado con CTB a dosis de 6 µg/mL administrando un volumen de 7,5µL de cada componente. Cada hámster fue inmunizado a los días 0, 7 y 28. Se colectaron muestras
40 de sangre por vía retroorbital y muestras de saliva colocando pequeñas tiras de celulosa en la cavidad oral, antes de la primera inmunización y 7 días después de la última inmunización. Al grupo de hámster control se le administró solución amortiguadora de fosfatos.

Para evaluar la protección conferida se determinaron parámetros como la excreción de ETEC en heces mediante coprocultivos e identificación por la prueba de hemaglutinación en presencia de D-manosa como ya previamente se ha reportado (López-Vidal Y. Colonization Factor antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (Monoclonal
45 Antibodies and Methods for Epidemiological Studies).1990. Goteborg, Suecia. Tesis Doctoral) y la determinación de la presencia de signos de diarrea la cual fue evaluada de acuerdo a la gravedad: 0, sin diarrea; 1, pérdida de la consistencia de las heces pero sin la cola mojada; 2, región perianal y cola húmedas y; 3, cola, patas y abdomen bajo mojados y con apariencia inactiva (Arredondo LJ, Zaragoza S, Domínguez M, Willms K, López-Vidal Y, Cravioto A. Desarrollo de un nuevo Modelo Animal Experimental Hámster Sirio Dorado para el estudio de la
50 infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). Enf Infec Microbiol. 1997; 17(2):43-46).

Para evaluar la respuesta inmune protectora se determinaron los títulos de anticuerpos por ELISA contra: CLE, fimbria CFA/I y contra CTB y LT. Y para determinar la capacidad de estos anticuerpos de aglutinar ETEC que poseen diferentes tipos de fimbrias pertenecientes a la familia CFA/I se llevó a cabo un ensayo de capacidad
55 aglutinante con una suspensión de bacterias formalinizadas (1×10^8 UFC) que expresan la fimbria CFA/I y sueros de hámsteres inmunizados con la vacuna e infectados con ETEC que expresa CFA/I. Así mismo se determinó la actividad neutralizante de los anticuerpos séricos anti-CTB de hámsteres inmunizados y retados contra la toxina colérica (CT) y contra LT (5µg/ml) por permeabilidad celular en conejos Nueva Zelanda.

Los resultados obtenidos demostraron en cuanto a la excreción de ETEC y la presencia de signos de diarrea que el promedio de duración de la diarrea causada por ETEC fue 3 veces mayor en los hámsteres control que en los hámsteres inmunizados. El porcentaje promedio de excreción de ETEC se incrementó 2,5 veces en el grupo control como se muestra en la figura 4

5 En cuanto al título al título de anticuerpos contra el CLE, CFA/I y la enterotoxinas por ELISA se compararon los niveles de anticuerpos IgG, en hámsteres inmunizados con la vacuna y hámsteres controles, después de ser infectados con ETEC que expresa CFA/I; las diferencias mostraron ser significativas contra el CLE, pero no así contra CFA/I lo que se muestra en la figura 5. Por otro lado, se detectaron altos títulos contra el CLE, CFA/I, CTB de *V. cholerae* y LT de ETEC. Estos títulos permanecieron constantes, antes y después de la infección oral, con ETEC
10 que expresa CFA/I como se muestra en la figura 6. Además se encontró que estos anticuerpos anti-CLE fueron capaces de aglutinar significativamente a la bacteria completa, que expresa CFA/I a un título de 2,6 y los anticuerpos contra CTB, a un título de 2; fueron capaces de neutralizar al 100% la actividad de (5 µg/ml) de las toxinas LT y CT.

Estos resultados demuestran la efectividad del uso de la vacuna intranasal contra la diarrea ocasionada por ETEC ya que en el modelo de hámster sirio dorado se generaron títulos altos de anticuerpos contra el CLE, CFA/I, LT de ETEC y CTB de *V. cholerae*, además de que estos anticuerpos fueron capaces de inducir protección contra la diarrea causada por ETEC que expresa CFA/I.
15

Finalmente, siendo ETEC un importante agente causal de diarrea infantil y del viajero a nivel mundial, su identificación no se realiza de manera cotidiana en el laboratorio, en parte debido a la necesidad de suministrar un tratamiento rápido y oportuno, sin embargo, el péptido de la SEQ. 1 divulgado en esta invención, se encuentra como un epitopo inmunodominante en las cepas de ETEC pertenecientes a la familia CFA/I, por lo que sería un excelente candidato para el desarrollo y elaboración de un reactivo de diagnóstico específico para esta familia de ETEC.
20

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universidad Nacional Autónoma de México
- Yolanda, López Vidal
- 25 Olga Roxana, Suaste Villanueva
- Ricardo, Godinez Moreno
- Luis José, Arredondo Hernández
- <120> Vacuna intranasal para uso contra la enfermedad ocasionada por *Escherichia coli* enterotoxigénica
- <130> PA/a/2005/011997
- 30 <140> PCT/MX2006/000116
- <141> 26-10-2006
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 35 <211> 20
- <212> PRT
- <213> *Escherichia coli* enterotoxigénica
- <220>
- <221> DISULFID
- 40 <222> (20)..(20)
- <400> 1

Tyr Ser Pro Ala Ser Lys Thr Phe Glu Ser Tyr Arg Val Met Thr Gln
1 5 10 15

Val His Thr Cys
20

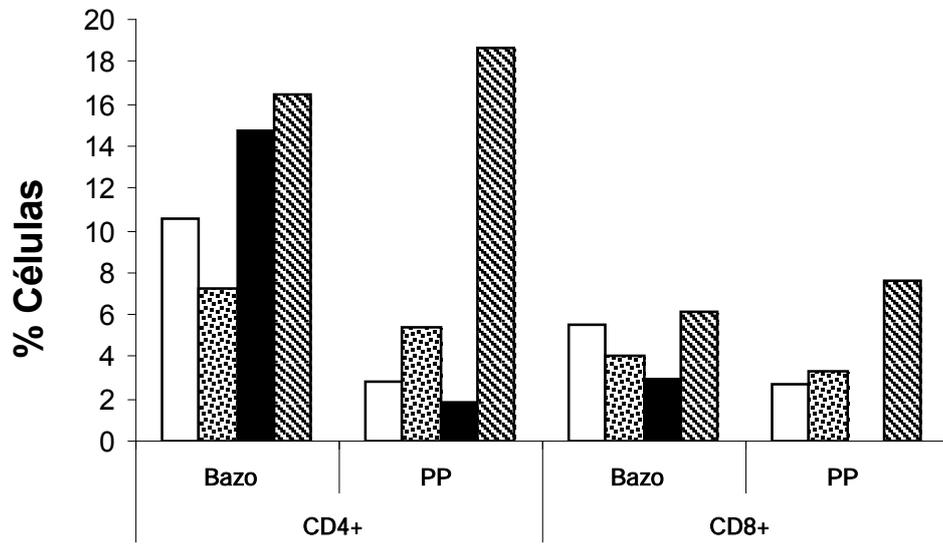
REIVINDICACIONES

1. El péptido CLE que consiste en la SEQ ID 1 conteniendo una cisteína terminal, que al ser administrado por vía intranasal a mamíferos es capaz de generar una respuesta inmune en placas de Peyer, ganglios linfáticos inguinales, cervicales y en el bazo.
- 5 2. El péptido de CLE de la reivindicación 1, en forma de dímeros, trímeros y pentámeros.
3. El péptido CLE de la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha respuesta inmune consiste en un incremento de linfocitos T CD4+ y T CD8+.
4. El péptido CLE de la reivindicación 3, **caracterizado por que** el incremento de linfocitos T CD4+ es dos veces mayor en placas de Peyer.
- 10 5. El péptido CLE de la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha respuesta inmune consiste en un incremento de la producción de citocinas en ganglios linfáticos inguinales y cervicales.
6. El péptido CLE de la reivindicación 5, **caracterizado por que** dichas citocinas proporcionan una respuesta Th2 desarrollando una protección humoral contra enfermedad por ETEC.
7. El péptido CLE de la reivindicación 5, **caracterizado por que** dichas citocinas son IL-4 e IL-10.
- 15 8. Una composición vacunal para administración intranasal contra enfermedades causadas por ETEC que consiste en el péptido CLE correspondiente a la SEQ ID N°: 1 asociado con un adyuvante en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. La composición vacunal de la reivindicación 8, **caracterizada por que** dicho adyuvante es CTB en una proporción de 8 partes de péptido frente a una parte de adyuvante.
- 20 10. La composición vacunal de la reivindicación 8, capaz de inducir una respuesta de linfocitos T CD4+ y DE generar la producción de citocinas tales como IL-4 e IL-10 estimulando una respuesta inmune de tipo humoral contra la enfermedad causada por ETEC.

Figura 1

Día	Grupo	Presencia de	
		ETEC en heces	Diarrea
0	Control	-	0
	CLE	-	0
	CTB	-	0
	CLE+CTB	-	0
1	Control	++++	0
	CLE	++++	0
	CTB	++++	0
	CLE+CTB	++++	0
3	Control	+++	1
	CLE	++	1
	CTB	++	1
	CLE + CTB	+	0
4	Control	-	0
	CLE	-	1
	CTB	-	0
	CLE + CTB	-	0
7	Control	-	0
	CLE	-	0
	CTB	-	0
	CLE + CTB	-	0

Figura 2



Subpoblaciones linfocitarias



Figura 3

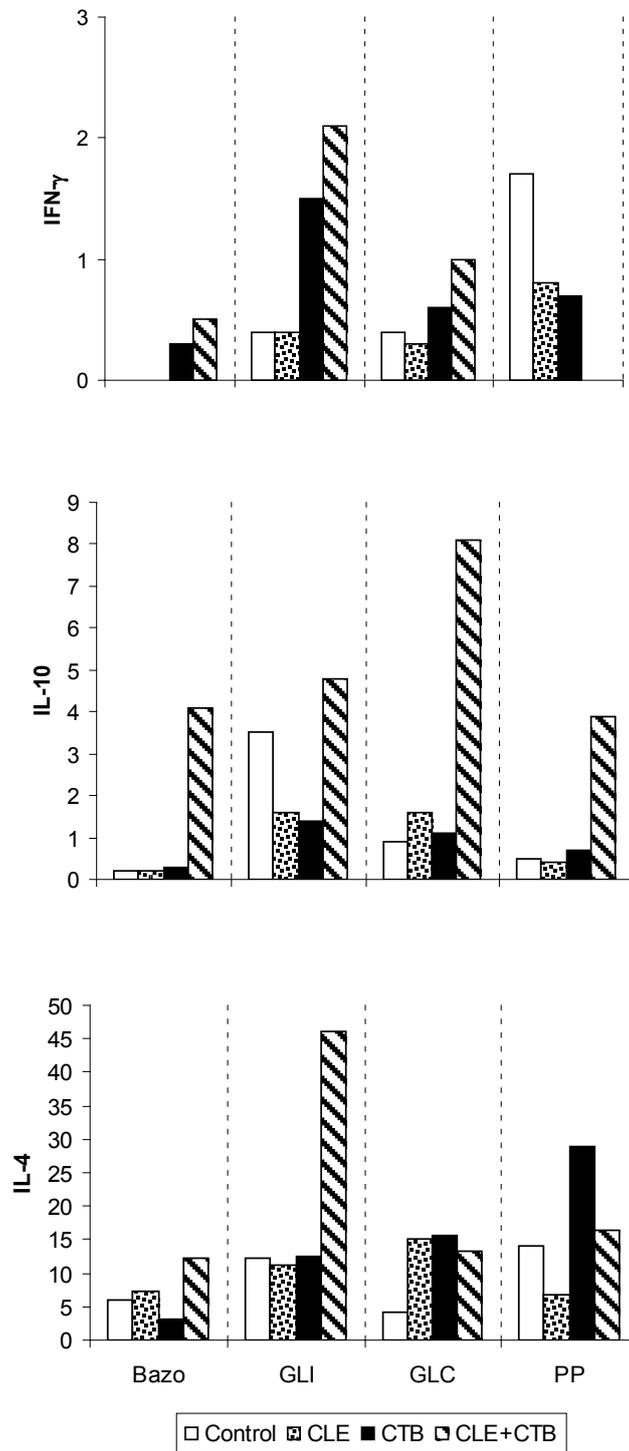


Figura 4

Grupo	n	Diarrea		Excreción de ETEC (días)
		Enfermos (%)	Duración (días)	
Control	11	82	2,45	5,75
Inmunizado	11	18	0,36	2,4

n = número de animales utilizados

Figura 5

Grupo	n	Anti-CLE (Absorbancia ± DE)	Anti-CFA/I (Absorbancia ± DE)
Control	7	0,631 ± 0,44	3,384 ± 0,242
Inmunizado	6	1,644 ± 0,23	3,457 ± 0,310
Valor p		0.000095	0,74258

n = número de animales utilizados

Figura 6

Grupo	n	Muestra (suero)	Anti-CLE	Anti-CFA/I	Anti-CTB	Anti-LT
Control	11	Tiempo final	< 1,4	< 1,4	< 1,4	< 1,4
Inmunizados	11	Tiempo final	2,8	2,9	3,7	3,7

n = número de animales utilizados, tiempo final = 8 días después del reto.