

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 094**

51 Int. Cl.:

A61K 39/108 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/425 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2007 E 07868328 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2170377**

54 Título: **Enterotoxina termolábil de E. coli mutada**

30 Prioridad:

18.07.2007 US 779419

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

02.06.2015

73 Titular/es:

**DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY
(100.0%)**

**N. 101, Lane 169, Kangning Street, Taipei County
Xizhi City, 221, TW**

72 Inventor/es:

**HSU, YU-SHEN;
LIN, YOUNG-SUN y
YUAN, TA-TUNG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 537 094 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

Enterotoxina termolábil de *E. coli* mutada

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 11/779.419 Presentada el 18 de Julio.

Antecedentes

10 Las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas causan diarrea en seres humanos y animales domésticos mediante la producción de dos tipos de enterotoxinas, esto es, la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST) (Hofstra et al., 1984, *J. Bio. Chem.* 259:15182-15187). La LT está funcionalmente, estructuralmente, e inmunológicamente relacionada con la toxina del cólera (CT) (Clements et al., 1978, *Infect. Immun.* 21:1036-39). La LT y la CT se sintetizan como moléculas de holotoxina integradas por cinco subunidades B idénticas y una subunidad A enzimáticamente activa (AB₅) (Spangler, 1992, *Microbio. Rev.* 56(4):622-647). El pentámero de B se une al gangliósido GM1 en la membrana de las células epiteliales intestinales o cualquier otra célula que contenga GM1 (van Heyningen, 1974, *Science* 183:656-657). Después de la unión de las subunidades B a GM1 en la superficie celular, la subunidad A es insertada en el citosol y escindida proteolíticamente y reducida en su único enlace disulfuro para producir un péptido A1 enzimáticamente activo y un péptido A2 más pequeño (Fishman PH, 1982, *J. Membr. Biol.* 69: 85-97; Mekalanos et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254: 5855-5861; Moss et al., 1981, *J. Biol. Chem.* 256:12861-12865). El péptido A1 es capaz de unirse a NAD y catalizar la ADP-ribosilación de Gsα, una proteína reguladora de unión a GTP asociada con adenilato ciclasa (Spangler, 1992, *Microbio. Rev.* 56(4):622-647). El incremento resultante de AMPc finalmente conduce a la liberación de electrolitos y fluidos desde las células afectadas (Cheng et al., 2000, *Vaccine*, 18:38-49).

25 Se ha demostrado que LT funciona como coadyuvante mucosal e induce respuestas inmunitarias contra antígenos administrados simultáneamente por vía mucosal (Clements et al., 1988, *Vaccine*, 6:269-277; Elson CO. 1989, *Immunol. Today* 146:29-33; Spangler, 1992, *Microbio. Rev.* 56(4): 622-647). Sin embargo, la alta toxicidad de la LT de tipo salvaje ha limitado su uso clínico. Por lo tanto, es deseable generar LT mutadas que tengan toxicidad reducida al tiempo que conservan su inmunogenicidad.

30 El término "enterotoxina termolábil de *E. coli*" o "LT" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una enterotoxina termolábil producida por cualquier cepa de *E. coli* enterotoxigénica. El término "subunidad A de enterotoxina termolábil de *E. coli*" o "LT_A" se refiere a la subunidad A de LT. Incluye tanto la LT_A precursora, que contiene un péptido señal, como la LT_A madura que tiene el péptido señal eliminado.

Compendio

35 Esta invención se basa en el descubrimiento inesperado de que una LT que contiene una LT_A mutada muestra toxicidad reducida en comparación con su contraparte de tipo salvaje a la vez que mantiene la inmunogenicidad. Esta LT_A mutada tiene una sustitución de aminoácido en la posición correspondiente a la posición 61 de una LT_A de tipo salvaje, cuya secuencia de aminoácidos, SEQ ID NO: 5, se muestra a continuación.

40 Por consiguiente, esta invención caracteriza un polipéptido aislado que incluye una LT_A mutada que contiene un residuo de aminoácido distinto de S, T, y F, en la posición correspondiente a la posición 61 del SEQ ID NO: 5. El residuo de aminoácido de sustitución puede ser D, E, H, I, K, L, N, P, Q, R, Y o W. Puede ser un aminoácido de origen natural o un aminoácido de origen no natural, por ejemplo, un D-aminoácido o un β-aminoácido. En un ejemplo, la LT_A tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, 4, 8 o 10. Una LT que contiene esta LT_A mutada muestra toxicidad reducida, esto es, 10^{-5} veces la de una LT de tipo salvaje que contiene el SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, esta invención caracteriza una vacuna que contiene un antígeno y la LT_A mutada descrita más arriba. La vacuna puede incluir adicionalmente la subunidad B de LT, que forma con la LT_A mutada la proteína LT completa. El antígeno puede derivar de una bacteria o de un virus.

45 En otro aspecto más, esta invención caracteriza un ácido nucleico aislado que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica la LT_A mutante descrita anteriormente. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos tiene los SEQ ID NO: 1, 3, 7, o 9. También está dentro del alcance de esta invención un vector que incluye el ácido nucleico que se acaba de describir y una célula transformada que contiene el vector.

50 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

Descripción detallada

Una LT destoxificada, p. ej., que contiene una LT_A mutada, es un coadyuvante de vacuna deseado debido a su alta inmunogenicidad. La LT_A mutada de esta invención, diseñada para lograr este propósito, se prepara mediante la introducción de una sustitución de aminoácido en una LT_A en una posición correspondiente a la posición 61 del SEQ ID NO: 5. Las LT_A producidas por diferentes cepas de *E. coli* enterotoxigénicas son altamente homólogas. Por lo tanto, mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos de una LT_A con el SEQ ID NO: 5, un experto en la técnica puede averiguar qué posición en esta LT_A corresponde a la posición 61 del SEQ ID NO: 5. Al igual que la LT_A del SEQ ID NO: 5, casi todas las LT_A de tipo salvaje incluyen una serina en la posición correspondiente a la posición 61 del SEQ ID NO: 5. Se puede utilizar como sustituyente un aminoácido que sea diferente de la serina, por ejemplo, en tamaño o polaridad. Los ejemplos de los aminoácidos sustituyentes incluyen residuos de aminoácidos hidrófobos (p. ej., I y L), cargados de residuos de aminoácidos (p. ej., D, E, K, R y H), o residuos de aminoácidos con cadenas laterales voluminosas (p. ej., N, Q, Y, y W). La prolina también se puede utilizar como sustituyente ya que generalmente altera la estructura local de un polipéptido. Estos aminoácidos sustituyentes incluyen aminoácidos de origen no natural, por ejemplo, D-aminoácidos o β-aminoácidos.

La LT_A mutante de esta invención se puede preparar por medio de métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el mutante se produce mediante un método recombinante como sigue. Un ADNc que codifica una LT_A de tipo salvaje se aísla de una cepa enterotoxigénica de *E. coli* y se somete a mutagénesis dirigida al sitio para producir un ADNc que codifica la LT_A deseada mutante. Véase Ho et al., *Gene*, 77: 51-59, 1989. El ADNc que porta la mutación a continuación, se inserta en un vector de expresión para la transformación de células. Por último, la LT_A mutante producida en las células transformadas se purifica y se ensambla con la subunidad B de LT para formar la proteína LT completa.

La toxicidad de una LT que contiene un mutante de LT_A descrito anteriormente se puede evaluar utilizando análisis tales como el análisis de células suprarrenales Y-1. Véase Cheng et al., *Vaccine*, 18:38-49, 2000.

El mutante de LT_A de esta invención se puede utilizar como coadyuvante en una vacuna. La vacuna (es decir, una vacuna humana o una vacuna veterinaria) puede contener un antígeno y el propio mutante de LT_A o una LT que contiene el mutante de LT_A. El antígeno puede derivar de una bacteria, p. ej., *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Chlamydia spp.*, *Helicobacter pylori*. También puede derivar de un virus, p. ej., influenza, virus herpes simplex, virus de la inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis delta, poliovirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de Epstein-Barr, virus de la varicela zoster, virus respiratorio sincitial, enterovirus o virus de la encefalitis japonesa.

La vacuna puede contener adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato o una disolución de bicarbonato. El vehículo se selecciona basándose en el modo y la ruta de administración, y la práctica farmacéutica convencional. Los vehículos y diluyentes farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para su uso, se describen en Remington Pharmaceutical Sciences.

Los métodos para preparar vacunas son generalmente bien conocidos en la técnica, como se ilustra en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; y 4.596.792. Las vacunas se pueden preparar en forma de inyectables, en forma de disoluciones líquidas o emulsiones. El antígeno y el mutante de LT_A o la LT que lo contiene se pueden mezclar con excipientes fisiológicamente aceptables, que pueden incluir, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La vacuna puede contener adicionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH para mejorar la eficacia de las vacunas. Las vacunas se pueden administrar por vía parenteral, mediante inyección subcutánea o intramuscular. Alternativamente, pueden ser deseables otros modos de administración, incluyendo supositorios, formulaciones orales, o tópicas. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de sacarina, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos.

La vacuna se administra de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que es terapéuticamente eficaz, protectora e inmunogénica. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se vaya a tratar, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, y si fuera necesario, para producir una respuesta inmunitaria mediada por células. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para ser administradas dependen del criterio del médico a cargo. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados son fácilmente determinables por un experto en la técnica y pueden ser del

orden de microgramos del polipéptido de esta invención. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo son también variables, pero pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores. La dosificación de la vacuna también puede depender de la ruta de administración y varía de acuerdo con el tamaño del anfitrión.

- 5 Los ejemplos específicos de más abajo se deben considerar meramente ilustrativos, y no limitantes del resto de la descripción en modo alguno. Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción de la presente memoria, utilizar la presente invención en toda su extensión.

Ejemplo 1: Construcción de genes que codifican LT_A de tipo salvaje y LT_A mutada de LT

- 10 Se aisló un fragmento de ADN de 1,8 kb de un gen de LT, incluyendo tanto la subunidad A como la subunidad B, de *E. coli* H10407 enterotoxigénica humana y se clonó en el vector pBluescript II KS (-) (pBluescript-LThWT). La secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) del gen LT (que codifica las subunidades tanto A como B) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de la subunidad A de esta LT se muestran a continuación:

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) de LT (Subunidad A: 1-777; Subunidad B: 774-1148)

```

atgaaaaata taactttcat tttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
gacaaattat accgtgctga ctctagacct ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtctt
120
atgccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aatgaatat taatctttat
180
gatcacgcga gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgtttccact
240

tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact
300
tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattagge
360
gtatacagcc ctcaccata tgaacaggag gtttctgcgt taggtggaat accatattct
420
cagatatatg gatggtatcg tgtaattttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac
480
agggaaatata gagaccggta ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatggttac
540
agattagcag glllccacc ggalcaccaa gcttggagag aagaaccctg gattcatcat
600
gcaccacaag gttgtggaaa tcatcaaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag
660
accagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat caaaagttaa gaggcagata
720
ttttcagact atcagtcaga gggtgacata tataacagaa ttcggaatga attatgaata
780
aagtaaaatg ttatgtttta tttacggcgt tactatcctc tctatgtgca tacggagctc
840
cccagtctat tacagaacta tgttcggaat atcgcaacac acaaatatat acgataaatg
900
acaagatact atcatatacg gaatcgatgg caggcaaaag agaaatggtt atcattacat
960
ttaagagcgg cgcaacattt caggtcgaag tcccgggcag tcaacatata gactcccaaa
1020
aaaaagccat tgaaaggatg aaggacacat taagaatcac atatctgacc gagacccaaa
1080
ttgataaatt atgtgtatgg aataataaaa cccccaattc aattgcggea atcagtatg
1140
aaaactag

```

15

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de LT_A madura

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
STSLSLRSAH LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFNVNDV LGVYSPHPYE QEVSAALGGIP
 120
 YSQIYGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI
 180
 HHAPQGCNS SRTITGDTCN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL
 240

Se construyeron varios mutantes de LT_A utilizando un método de mutagénesis dirigida al sitio (Ho et al., 1989, *Gene* 77, 51-59). Más específicamente, se construyeron mutantes de LT_A, incluyendo LT_A(61K), LT_A(S61R), LT_A(S61H), LT_A(S61Y) y LT_A(S61F) reemplazando la serina de la posición 61 del SEQ ID NO: 5 por K, R, H, Y, y F, respectivamente. Se utilizaron los siguientes cebadores oligonucleotídicos para construir estos mutantes: LT_A(S61K) [5' TCT CAA ACT AAG AGA AGT TTT AAC ATA TCC GTC ATC ATA 3'] (SEQ ID NO: 11), LT_A(S61R) [5' ACT TCT CAA ACT AAG AGA AGT TCT AAC ATA TCC GTC ATC 3'] (SEQ ID NO: 12), LT_A(S61F) [5' ACT TCT CAA ACT AAG AGA AGT GAA AAC ATA TCC GTC ATC 3'] (SEQ ID NO: 13), LT_A(S61Y) [5' ACT TCT CAA ACT AAG AGA AGT ATA AAC ATA TCC GTC ATC 3'] (SEQ ID NO: 14), LT_A(S61H) [5' ACT TCT CAA ACT AAG AGA AGT ATG AAC ATA TCC GTC ATC 3'] (SEQ ID NO: 15). Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de estas LT_A se muestran a continuación:

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) de LT_A(S61K)

atgaaaaata taactttcat tttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
 gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggagggtctt
 120
 atgcccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aatgaatat taatctttat
 180
 gatcacgcga gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgttaaaact
 240
 tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact
 300
 tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattaggc
 360
 gtatacagcc ctcaccata tgaacaggag gtttctgcgt taggtggaat accatattct
 420
 cagatatatg gatggtatcg tgtaattttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac
 480
 agggaatata gagaccggtg ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatggttac
 540
 agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttggagag aagaaccctg gattcatcat
 600
 gcaccacaag gttgtggaag ttcacaaaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag
 660
 acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aatatcaat caaaagttaa gaggcagata
 720
 ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa ttcggaatga attatga
 777

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de LT_A(S61K)

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
KTSLSLRSAH LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFNVNDV LGVYSPHPYE QEVSAALGGIP
 120
 YSQIYGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI
 180
 HHAPQGCNS SRTITGDTCN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL
 240

15

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:3) de LT_A(S61R)

ES 2 537 094 T3

atgaaaaata taactttcat tttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtctt
120
atgccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aatgaatat taatctttat
180
gatcacgca gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgttagaact
240
tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact
300
tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattaggg
360
gtatacagcc ctcaaccata tgaacaggag gtttctgcgt taggtggaat accatattct
420
cagatatatg gatggatcg tgtaatttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac
480
agggaaatata gagaccgcta ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatggttac
540
agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttgagag aagaaccctg gattcatcat
600
gcaccacaag gttgtgaaa ttcatacaaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag
660
accagaatc tgagcacaat atatctcagg aatatcaat caaaagttaa gaggcagata
720
ttttcagact atcagtcaga gttgacata tataacagaa ttcggaatga attatga
777

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de LT_A (S61R)

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
RTSLSLRSAH LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFNVNDV LGVYSPHPYE QEVSA LGGIP
120
YSQIYGWYRV NFGVIDERLH RNREYDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI
180
HHAPQCGNS SRTITGDCN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL
240

5 Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) de LT_A(S61H)

atgaaaaata taactttcat tttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtctt
120
atgccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aatgaatat taatctttat
180
gatcacgca gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgttcatact
240
tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact
300
tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattaggg
360
gtatacagcc ctcaaccata tgaacaggag gtttctgcgt taggtggaat accatattct
420
cagatatatg gatggatcg tgtaatttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac
480
agggaaatata gagaccgcta ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatggttac
540
agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttgagag aagaaccctg gattcatcat
600

ES 2 537 094 T3

gcaccacaag gttgtggaaa ttcatacaaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag
660
accagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat caaaagtaa gaggcagata
720
ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa ttcggaatga attatga
777

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de LT_A (S61H)

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
HTSLSLRSAH LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFVNVDV LGVYSPHPYE QEVSAALGGIP
120
YSQIYGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI
180
HHAPQCGNS SRTITGDTCN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL
240

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 9) de LT_A(S61Y)

atgaaaaata taactttcat tttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtcct
120
atgccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aaatgaatat taatctttat
180
gatcacgca gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgtttatact
240
tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact
300
tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattaggc
360
gtatacagcc ctcaccata tgaacaggag gtttctgcgt taggtggaat accatattct
420
cagatatatg gatggtatcg tgttaatfff ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac
480
agggaaata gagaccgta ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatggttac
540
agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttggagag aagaaccctg gattcatcat
600
gcaccacaag gttgtggaaa ttcatacaaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag
660
accagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat caaaagtaa gaggcagata
720
ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa ttcggaatga attatga
777

5

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de LT_A(S61Y)

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
YTSLSLRSAL LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFVNVDV LGVYSPHPYE QEVSAALGGIP
120
YSQIYGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI
180
HHAPQCGNS SRTITGDTCN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL
240

10 Para la comparación, también se construyó otro mutante de LT, LT_p (S63K), derivado de EWD299 (Dallas et al., 1979, *J. Bacteriol.* 139, 850-859) mediante la sustitución de serina de la posición de aminoácido 63 de la subunidad A por lisina.

Ejemplo 2: Preparación de LT de tipo salvaje y LT que contiene LT_A mutada

Se transformaron vectores pBluescript II KS (-) que contenían genes de LT nativas o mutantes, incluyendo genes tanto para la subunidad A como para la subunidad B, en *E. Coli* HB101. Las LT nativas y mutantes se purificaron a partir de cultivos desarrollados durante la noche en un matraz de 3 litros que contenía caldo L con un suplemento de 100 µg de ampicilina por ml. Las células se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón TEAN (NaCl 0,2 M, Tris 50 mM, EDTA 1 mM y NaN₃ 3 mM, pH 7,4), y se lisaron con un microfluidificador (Microfluidics Corporation, USA). Después de que los lisados se aclararon mediante centrifugación, la LT se fraccionó mediante la adición de sulfato de amonio sólido a una saturación de 65%. La preparación se suspendió en tampón TEAN, se dializó cuidadosamente contra el mismo tampón y se utilizó como LT bruta. La LT bruta se sometió a cromatografía en columnas de D-galactosa inmovilizadas (Pierce, Rockford, IL) equilibradas con tampón TEAN a 4°C (Uesaka et al., 1994, *Microbial Pathogenesis* 16: 71-76). Las LT nativas y mutantes se eluyeron con galactosa 0,3 M en TEAN. Cada toxina purificada se dializó frente a tampón PBS para los análisis biológicos e inmunológicos.

Las LT de tipo salvaje y mutante purificadas se separaron mediante SDS-PAGE, en donde el peso molecular de la subunidad A de LT era de aproximadamente 28 a 29 kDa, y el peso molecular de la subunidad B LT era de aproximadamente 12 a 13 kDa. Los rendimientos de la LT completa que contenía la LT_A(S61K), es decir LTh(S61K) y LT_A (S61R), es decir LTh(S61R) fueron similares a los de LT que contenía la LT_A del SEQ ID NO: 5.

Los heterohexámeros AB₅ y los pentámeros B₅ de la LT se separaron mediante gel de isoelectroenfoque de pH 3-10 (Invitrogen). La intensidad de las bandas de proteína AB₅ y B₅ se analizó mediante el soporte lógico UVIBand (UVIttec Limited) para calcular el porcentaje de los heterohexámeros AB₅ y los pentámeros B₅ (El valor del punto isoelectrico (pI) de AB₅ estuvo entre 8,0 y 7,8, y el valor pI de B₅ estuvo entre 8,3 y 8,1), los resultados se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación LT de tipo salvaje y LT que contiene LT_A mutada

Enterotoxina termolábil (LT) de <i>E. Coli</i>	Razón de AB ₅ /AB ₅ + B ₅ (%)
LTh(WT)	91(%)
LTh(S61K)	92(%)
LTh(S61R)	85(%)
LTh(S61H)	60(%)
LTh(S61F)	70(%)
LTh(S61Y)	57(%)
Los porcentajes de AB ₅ de LTh (S61K) y LTh (S61R) purificadas fueron de aproximadamente 90-100%.	

Ejemplo 3: Determinación del efecto de LT de tipo salvaje y LT que contiene LT_A mutada sobre los niveles intracelulares de AMPc

Células Caco-2 (ATCC HTB-37) se mantuvieron en medio MEM-α con un suplemento de FBS al 20% en una placa de 24 pocillos a una concentración de 5×10^4 células por pocillo, se desarrollaron hasta casi la confluencia, y se incubaron en MEM-α que contenía FBS al 1% y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 1 mM durante 30 min en CO₂ al 5% antes de la adición de las toxinas (Grant et al., 1994, *Infection and Immunity* 62: 4270-4278). Se añadió LT nativa o mutante a cada pocillo y se incubó durante 4 horas. A continuación las células se lavaros dos veces con PBS frío. El AMPc intracelular se extrajo mediante la adición de 200 µl de HCl 0,1 N a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El sobrenadante de los productos lisados celulares se recogió después de la adición de NaOH 0,1 N a cada pocillo (Cheng et al., 2000, *Vaccine*, 18: 38-49; Park et al., 1999, *Experimental and Molecular Medicine* 31: 101-107). El AMPc se midió con un kit de inmunoanálisis enzimático para AMPc (Assay designs; Correlate-EIA). Los resultados obtenidos de este ejemplo demuestran que LTh(S61K) no aumentaba la concentración de AMPc intracelular.

Ejemplo 4: Determinación de la toxicidad de LT que contiene LT_A mutada utilizando el análisis de células tumorales suprarrenales Y1

5 En este estudio, se evaluaron muestras de LT, incluyendo LT de tipo salvaje, mutante de sitio activo de LT (h61K), y complejo de subunidades B de LT, B5, para determinar el efecto enterotóxico. Se sembraron células tumorales suprarrenales Y-1 de ratón (ATCC CCL-79) mantenidas en medio F12 de Ham con un suplemento de suero de caballo al 15%, suero bovino fetal al 2,5%, L-glutamina 2 mM, y 1,5 g/L de bicarbonato de sodio en placas de fondo plano de 96 pocillos - a una concentración de 2×10^4 células por pocillo (200 μ l/pocillo) a 37°C en CO2 al 5% durante 48 hrs. Las células de las placas de fondo plano de 96 pocillos se lavaron dos veces con 1x PBS (pH 7,4) y a continuación se trataron con muestras de LT diluidas seriadamente (10 μ g/200 μ l ~ 10-10 μ g/200 μ l) a 37°C en CO2 al 5% durante la noche. Las células se examinaron mediante microscopía óptica para determinar el redondeo celular típico 24 horas después del tratamiento con toxina. La actividad se define como la concentración mínima de toxina requerida para iniciar el redondeo celular (ECi) o la concentración de toxina requerida para un redondeo celular de 50% (CE50). Véanse David et al., 1975, *Infection and Immunity*, 11: 334-336; Cheng et al., 1999, *Vaccine*, 18: 38-49. La toxicidad de LTh(S61K), LTh(S61R), LTh(S61H) es significativamente menor en comparación con la LT de tipo salvaje, es decir, 10^{-6} frente a 1. Véase la siguiente Tabla 2. La toxicidad de LTh(S61F) también es menor (es decir, 10^{-5}), pero la reducción no es tan significativa como con los otros mutantes.

15 Tabla 2 Toxicidad de LT que contiene LT_A de tipo salvaje o mutada

Enterotoxina termolábil (LT) de <i>E. Coli</i>	Cantidad de LT (pg/pocillo)	Intensidad tóxica (LT de tipo salvaje es 1)
LTh(WT)	0,1	1
LTh(S61K)	100000	10^{-6}
LTh(S61R)	100000	10^{-6}
LTh(S61H)	100000	10^{-6}
LTh(S61F)	10000	10^{-5}
LTh(S61Y)	100000	10^{-6}
LTh(S63K)	10000	10^{-5}

Ejemplo 5: Determinación de la toxicidad de LT que contiene LT_A mutada mediante análisis del asa ileal de conejo

20 El análisis se realizó como se ha descrito previamente (Giannelli et al., 1997, *Infection and Immunity* 65: 331-334; Giuliani et al., 1998, *J. Exp. Med.* 187:1123-1132). Se utilizaron conejos adultos New Zealand, ~ 2,5 Kg cada uno, para este análisis. Las asas, cada una de 5 cm de longitud, se prepararon comenzando en el extremo del intestino delgado del conejo y moviéndose hacia el estómago. Se inyectaron muestras de 0,5 ml con diversas cantidades de LT o mutantes de LT en cada asa y a continuación se cerró el abdomen. Después de 18 horas, se recogió y se midió el líquido acumulado en cada asa. El experimento se realizó tres veces y los resultados se expresaron en mililitros por centímetro. Los resultados de este experimento demuestran que 500 μ g de LTh(S61K), solo acumularon 1 ml de fluido en el asa ileal de conejo, y el volumen del fluido acumulado fue similar al del control nativo. Cuando se utilizaron 0,1 μ g de LT de tipo salvaje, el volumen de fluido acumulado de LT de tipo salvaje fue considerablemente mayor que el de LTh(S61K). Además, la acumulación de fluido de la otra LTh(S63K) también fue considerablemente mayor que el de LTh(S61K).

Ejemplo 6: Determinación de efecto coadyuvante de LT que contiene LT_A mutada en la inmunización intranasal

30 Se utilizó en este ejemplo virus Influenza desactivado, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8) (ATCC VR-95). Las partículas virales se prepararon como se ha descrito anteriormente (Aitken et al., 1980, *Eur. J. Biochem.* 107: 51-56; Gallagher et al., 1984, *J. Clin. Microbiol.* 20: 89-93; Johansson et al., 1989, *J. Virol.* 63: 1239-46). En resumen, el virus se propagó en la cavidad alantoidea de huevos de gallina embrionados de 10 días de edad a 35°C durante dos días. El fluido alantoideo de los huevos infectados con PR8 se centrifugó primero a baja velocidad y después se centrifugó a 96.000xg durante 1 hora para precipitar las partículas virales, que se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Estas partículas se cargaron en un gradiente de densidad de sacarosa de 30-60% y se centrifugaron durante 5 horas a 96.000xg. Se recogió la fracción que contenía el virus y se diluyó con PBS. El virus se sedimentó adicionalmente a 96.000xg durante 1 hora y se resuspendió en PBS. El virus purificado se trató con formalina al 0,025% a 4°C durante una semana. La concentración de proteína se midió y se normalizó

basándose en la densidad óptica, Bio-Rad Proteína Assay, y se determinó el contenido de hemaglutinina (HA) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Oxford et al., 1981, *J. Biol. Stand.* 9: 483-491).

5 Se obtuvieron ratones BALB/c hembra, entre 6 y 8 semanas de edad, del Taiwán National Laboratory Animal Center. Se inmunizaron por vía intranasal grupos que consistían en cinco ratones cada uno con 25 µl de PBS que contenía 20 µg de virus Influenza inactivados (flu.Ag) solos o combinados con 8 µg de LT nativa o mutante bajo anestesia. Los ratones se volvieron a inmunizar 3 semanas más tarde. Los ratones de control recibieron PBS en las mismas condiciones. Dos semanas después de la inmunización final, los ratones de cada grupo se sacrificaron para obtener el suero y llevar a cabo el análisis de inhibición de la hemaglutinación (IH). Se detectaron títulos de IH significativamente mejorados en ratones inmunizados por vía intranasal con la vacuna de virus inactivados combinados con LTh(S61K) o LTp(S63K) en comparación con los ratones inmunizados por vía intranasal con la vacuna de virus inactivados solos. El título de IH de LTh(S61K) combinada con el virus inactivado se incrementó sustancialmente. El título de IH de LTh(S61K) combinada con el virus es 813, similar al de LTh(S63K) combinada con el virus, pero mayor que el del virus solo.

Ejemplo 7: Determinación de efecto coadyuvante de LT que contiene LT_A mutada en la inmunización intramuscular

15 Se repitió el procedimiento llevado a cabo en el Ejemplo 6 excepto que la inmunización utiliza liberación intramuscular. Se prepararon vacunas intramusculares en 50 µl de PBS que contenía 10 µg de vacuna de virus inactivado solos o combinados con 4 µg de LT nativa o mutante y se inyectaron en el músculo posterior del muslo. Se realizaron los programas de inmunización y de muestreo como se ha descrito. El título de IH de LTh(S61K) combinada con el virus inactivado se incrementó sustancialmente. El título IH de LTh(S61K) combinada con el virus fue 512, que es significativamente mayor que el de LT de tipo salvaje combinada con el virus o el del virus solo.

Otras realizaciones

25 Todas las características descritas en esta memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica descrita en esta memoria descriptiva puede sustituirse por una característica alternativa que sirve para el mismo, equivalente, o similar propósito. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica descrita solo es un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

A partir de la descripción anterior, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las características esenciales de la presente invención, y sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende una subunidad A de enterotoxina termolábil de *E. coli*, teniendo la subunidad A de enterotoxina termolábil de *E. coli* una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en los SEQ ID NO: 2, 4, 8, y 10, en donde una enterotoxina termolábil de *E. coli* que contiene la subunidad A que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de el grupo que consiste en los SEQ ID NO: 2, 4, 8 y 10 tiene una toxicidad reducida en comparación con una enterotoxina termolábil de *E. coli* de tipo salvaje que contiene el SEQ ID NO: 5.
2. Una vacuna que comprende un antígeno y un coadyuvante, siendo el coadyuvante una subunidad A de la enterotoxina termolábil de *E. coli*, teniendo la subunidad A de la enterotoxina termolábil de *E. coli* mutada una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en los SEQ ID NO: 2, 4, 8, y 10, en donde una enterotoxina termolábil de *E. coli* que contiene la subunidad A que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en los SEQ ID NO: 2, 4, 8 tiene una toxicidad reducida en comparación con una enterotoxina termolábil de *E. coli* de tipo salvaje que contiene el SEQ ID NO: 5.
3. La vacuna de la Reivindicación 2, en donde el antígeno es de una bacteria o un virus.
4. La vacuna de la Reivindicación 3, en donde la bacteria se selecciona de un grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, y *Haemophilus influenza b*, y en donde el virus se selecciona de un grupo que consiste en virus Influenza, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del papiloma humano, enterovirus, y rotavirus.
5. La vacuna de cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 4, que comprende adicionalmente la subunidad B de LT, en donde el mutante de la subunidad A y la subunidad B forman la enterotoxina termolábil de *E. coli* completa.
6. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad A de la enterotoxina termolábil de *E. coli*, teniendo la subunidad A de la enterotoxina termolábil de *E. coli* una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en los SEQ ID NO: 2, 4, 8, y 10, en donde la enterotoxina termolábil de *E. coli* que contiene la subunidad A que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en los SEQ ID NO: 2, 4, 8 tiene una toxicidad reducida en comparación con una enterotoxina termolábil de *E. coli* de tipo salvaje que contiene el SEQ ID NO: 5.
7. El ácido nucleico de la Reivindicación 6, en donde la secuencia de nucleótidos se selecciona de un grupo que consiste en los SEQ ID NO: 1, 3, 7, y 9.
8. Un vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las Reivindicaciones 6 o 7.
9. Una célula transformada que comprende el vector de la Reivindicación 8.