

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 246**

51 Int. Cl.:

A61K 39/108 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)
A61P 27/14 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2010 PCT/US2010/033336**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11119174**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2010 E 10848606 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2550013**

54 Título: **Tratamiento de alergia con enterotoxina termolábil de E. coli destoxificada**

30 Prioridad:

23.03.2010 US 729649

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2017

73 Titular/es:

**DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY
(100.0%)
No. 101 Lane 169 Kangning St.
New Taipei City 221, TW**

72 Inventor/es:

**HSU, YU-SHEN y
WANG, JIU-YAO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 641 246 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

Tratamiento de alergia con enterotoxina termolábil de *E. coli* destoxificada

5 **Antecedentes de la invención**

El asma alérgica, mediada por respuestas inmunitarias de tipo Th2 patológicas, es un problema de salud importante en los países occidentales. Los síntomas de asma alérgica incluyen el aumento de la producción de moco y de la hiperreactividad de las vías respiratorias. La exposición repetida a alérgenos es un importante factor que contribuye a esta enfermedad.

Los esteroides y otros fármacos antiinflamatorios se utilizan habitualmente para el tratamiento del asma alérgica. Estos medicamentos solo alivian los síndromes de asma y no impiden la aparición de respuestas inmunitarias alérgicas. Recientemente, se ha desarrollado una vacuna para la alergia como un enfoque preventivo. Una vacuna típica para la alergia contiene un alérgeno (por ejemplo, un alérgeno de polen o un alérgeno microbiano) para inducir respuestas inmunitarias específicas y un adyuvante (por ejemplo, oligonucleótido CpG o una enterotoxina termolábil de *E. coli* mutada) para mejorar las respuestas inmunitarias específicas de alérgeno. Por ejemplo, el documento JP 2003-012556 A enseña una composición farmacéutica para tratar enfermedades alérgicas. La composición comprende un antígeno como causa de la alergia y una sustancia inmunorreguladora (por ejemplo, toxina del cólera destoxificada (CT)).

Sumario de la invención

La presente invención se basa en un descubrimiento inesperado de que una mutante de la enterotoxina termolábil de *E. coli* desintoxicado, sola o en combinación con un alérgeno, es eficaz en el tratamiento del asma alérgica.

En consecuencia, la presente invención proporciona una enterotoxina termolábil de *E. coli* destoxificada (LT) para su uso en el tratamiento de la alergia en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz para inducir una respuesta antialérgica en el sujeto. La LT destoxificada de la presente invención contiene una subunidad A mutada que contiene una mutación de aminoácido en la posición correspondiente a la posición 53, 61, 63, 69, 97, 104, 106, 110, o 112 en la SEQ ID NO: 1

En el presente documento se describe un método para tratar la alergia (por ejemplo, asma alérgica) mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo (por ejemplo, un ser humano que padece o está en riesgo de padecer alergia) un mutante de LT destoxificada en una cantidad eficaz para inducir una respuesta antialérgica. El mutante de LT destoxificado exhibe una toxicidad sustancialmente reducida en comparación con su homólogo de tipo silvestre. A saber, su nivel de toxicidad no supera el 1 % del de su homólogo de LT de tipo silvestre cuando se determina en el ensayo de células suprarrenales convencionales Y-1 o no supera el 10 % del homólogo de tipo silvestre cuando se determina en el ensayo de células Caco-2 convencionales.

La LT destoxificada usada en el método descrito en el presente documento puede contener una subunidad A mutada, por ejemplo, una subunidad A mutante que incluye una sustitución de aminoácido en la posición correspondiente a la posición 61 o a la posición 63 en la SEQ ID NO: 1 mostrada a continuación. LTS61K y LTS63K son dos ejemplos. La LT destoxificada, sola o en combinación con un alérgeno, se puede formular en una composición farmacéutica para su administración por vía mucosa (por ejemplo, por vía intranasal o sublingual) o por otras vías (por ejemplo, administración transcutánea).

También se describe la composición farmacéutica mencionada anteriormente para su uso en el tratamiento de la alergia mediante, por ejemplo, administración mucosa o transcutánea, o para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se indican en la descripción que se presenta a continuación. Otras características o ventajas de la invención serán evidentes a partir de los siguientes dibujos y descripción detallada de diversas realizaciones y también a partir de las reivindicaciones adjuntas.

55 **Breve descripción de los dibujos**

Se describen primero los dibujos.

La Figura 1 es un diagrama que muestra un protocolo preventivo y un protocolo terapéutico para el tratamiento de ratones con asma con el mutante de LT LTS61K, alérgeno Der p, o una combinación de los mismos. La Figura 2 es un gráfico que muestra los niveles de AHR (representado por los valores de Penh) en ratones tratados con LTS61K, Der p o una combinación de los mismos (LTS61K/Der p) siguiendo el protocolo preventivo mostrado en la figura 1. *: $p < 0,05$ (LTS61 K-Der p frente a solución salina normal). +: $p < 0,05$ (LTS61K/Der p frente a Der p solo). ++: $P < 0,01$ (LTS61 K/Der p frente a Der p solo). Los valores p se obtuvieron mediante ANOVA de dos vías. LT representa LTS61K.

La Figura 3 es un diagrama que muestra los niveles de ciertas citocinas (A: IL-5; B: TNF- α ; C: IL-12; D: Eotaxina; y E: TARC) en fluidos de lavado broncoalveolar (BAL) de los ratones tratados con LTS61K, Der p o una combinación de los mismos (LTS61 K/Der p) siguiendo el protocolo terapéutico mostrado en la figura 1. *: $p < 0,05$ (LTS61K frente al control o LTS61K/Der p frente a solución salina normal). +: $p < 0,05$ (LTS61K frente a Der p solo o LTS61K/Der p frente a Der p solo). ++: $p < 0,01$ (LTS61K frente a Der p solo o LTS61K/Der p frente a Der p solo). Los valores de p se obtuvieron mediante prueba t de Student. LT representa LTS61K.

La Figura 4 es un diagrama que muestra el suero (panel a) y los niveles de fluido de BAL (panel b) de IgA específica DE Der-p en los ratones tratados con LTS61K, Der p o una combinación de los mismos (LTS61K/Der p) siguiendo el protocolo preventivo mostrado en la figura 1. *: $p < 0,05$ (LTS61K/Der p frente a Der p solo). ++: $p < 0,01$. (LTS61K/Der frente a solución salina normal). Los valores de p se obtuvieron mediante prueba t de Student. LT representa LTS61K.

La Figura 5 es un diagrama que muestra el suero (panel a) y los niveles de fluido de BAL (panel b) de IgA específica DE Der-p en los ratones tratados con LTS61K, Der p o una combinación de los mismos (LTS61K/Der p) siguiendo el protocolo terapéutico mostrado en la figura 1. *: $p < 0,05$ (LTS61K/Der p frente a Der p solo). +: $p < 0,05$ (LTS61 K/Der p frente a solución salina normal). Los valores de p se obtuvieron mediante prueba t de Student. LT representa LTS61K.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describe un método para tratar la alergia (por ejemplo, asma alérgica) con una cantidad eficaz de un mutante e LT destoxificado, solo o en combinación con un alérgeno. El término "tratar", como se usa en el presente documento, se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a un sujeto, que tiene una enfermedad alérgica, un síntoma de la enfermedad alérgica o una predisposición hacia la enfermedad alérgica, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperar, mejorar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad. "Una cantidad eficaz" del mutante LT destoxificado utilizado en los métodos descritos se refiere a la cantidad del mutante de LT necesaria para conferir efectos terapéuticos en un sujeto, es decir, inducir una respuesta antialérgica, aliviando de ese modo los síntomas alérgicos en el sujeto. Las respuestas antialérgicas incluyen la inhibición de la infiltración y reclutamiento de células inmunes activadas asociadas con respuestas alérgicas, la mejora de la secreción de IgA (particularmente IgA no específica de antígeno), la reducción de la secreción de TARC y la supresión de las respuestas inmunitarias de tipo Th2. Las respuestas inmunitarias de tipo Th2 se caracterizan por la liberación de citocinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13), lo que lleva a la generación de inmunidad humoral, activación de eosinófilos, regulación de la respuesta inmunitaria celular y estimulación de la producción de IgE. Las cantidades eficaces varían, tal como reconocen los expertos en la materia, dependiendo de la vía de administración, uso de excipientes y uso conjunto con otros agentes activos.

Un mutante de LT destoxificado adecuado para su uso en los métodos descritos muestra una citotoxicidad reducida sustancialmente en relación con su homólogo de tipo silvestre, tal como se determina en el ensayo de células suprarrenales Y-1 o el ensayo de células Caco-2, ambos conocidos bien en la materia. Véase, por ejemplo, David et al., 1975, *Infection and Immunity*, 11:334-336; Cheng et al., 1999, *Vaccine* 18:38-49; Grant, C.C. et al., 1994, *Infection and Immunity*, 62:4270-4278; Cheng, E. et al, 2000, *Vaccine*, 18:38-49; y Park, E. J. et al, 1999, *Experimental and molecular medicine*, 31: 101-107. A continuación se presentan breves descripciones de estos dos ensayos.

Para realizar el ensayo de células suprarrenales Y-1, se pueden sembrar células de tumor suprarrenal Y-1 (ATCC CCL-79), preferentemente mantenidas en medio F12 de Ham suplementado con suero de caballo al 1,5 %, suero fetal bovino al 2,5%, L-glutamina 2mM y 1,5 g/l de bicarbonato, 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 5 % de CO₂ durante 48 horas. Las células se lavan varias veces con 1x PBS (pH 7,4) y después se tratan con una LT de ensayo (bien LT de tipo silvestre o LT mutada) a varias concentraciones a 37 °C con suministro de 5 % de CO₂. Aproximadamente 24 horas después del tratamiento, las células se pueden observar bajo un microscopio óptico para examinar aparición de redondeo celular. La toxicidad de la LT en la muestra de ensayo se define como la concentración mínima de LT requerida para iniciar el redondeo celular (CE_i) o la concentración de LT necesaria para inducir el 50 % de redondeo celular (CE₅₀).

El ensayo de células Caco-2 se puede realizar del siguiente modo. Las células Caco-2 (ATCC HTB-37) se mantienen en medio MEM- α suplementado con 20 % de FBS en una placa de 24 pocillos a una concentración de 5×10^4 células por pocillo. Cuando las células se encuentran cerca de 100 % de confluencia, el medio de cultivo se reemplaza con MEM- α suplementado con 1 % de FBS y 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM (IBMX). Después de incubar durante 30 minutos con suministro de 5 % de CO₂, las células se mezclan con una LT de ensayo y se incuban durante 4 horas. Las células se lavan varias veces con PBS frío, se mezcla con 200 μ l de HCl 0,1 N durante 15 minutos a temperatura ambiente, y después se lisan, se recogen los sobrenadantes. Los niveles de AMPc en los sobrenadantes, que representan el nivel de toxicidad del LT de ensayo, se determinan mediante ELISA usando, por ejemplo, el kit proporcionado por los diseños del ensayo; Correlación-EIA.

El mutante de LT destoxificado se puede preparar mediante la introducción de una o más mutaciones en una LT de tipo silvestre, ya sea en su subunidad A o en su subunidad B, a través de tecnología de ingeniería genética

convencional. A continuación se muestran las secuencias de aminoácidos de una subunidad A de tipo silvestre (forma madura) y una subunidad B de tipo silvestre, y una secuencia de nucleótidos que codifica tanto las subunidades A como B.

5 **Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:1) de LT_A MADURA**

```

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
STLSLSLRSAL LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFVNDV LGVYSPHPYE QEVSALEGGIP 120
YSQIYGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI 180
HHAPOGCGNS SRTITGDTCN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL 240
    
```

10 **Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de LT_B MADURA**

```

MNVKVCYVLF TALLSSLCAY GAPOSITELC SEYRNTQIYT INDKILSYTE SMAGKREMVI 60
ITPKSGATFO VEVPGSQHID SQKKAIERMK DTLRITYLTE TKIDKLCVWN NKTPNSIAAI 120
SMEN
    
```

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:3) de LT (Subunidad A: 1-777; Subunidades B: 774-1148)

```

atgaaaaata taactttcat tttttttatt ttattagcat cgcattata tgcaaatggc 60
gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtcct 120
atgccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aatgaatat taatctttat 180
gatcacgca gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgtttccact 240
tctcttagtt tgagaagtgc tcaacttagca ggacagtota tattatcagg atattccact 300
tactatata atgttatago gacagcaoca aatatgttta atgttaatga tgtattaggc 360
gtatacagcc ctcaaccata tgaacaggag gttctcogt taggtggaat accatattct 420
cagatatatg gatggtatcg tgttaatttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac 480
agggaaata gagaccggtg ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatggttac 540
agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttgagag aagaacctg gattcatcat 600
gcaccacaag gttgtggaaa ttcatacaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag 660
accagaatc tgagcacaat atatctcagg aatatcaat caaaagttaa gaggcagata 720
tttccagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa ttcggaatga attatgaata 780
aagtaaaatg ttatgtttta ttaaggcgt tactatctc tctatgtgca tacggagctc 840
cccagctat tacagaacta tgttcggaat atcgcaaac acaaatatat acgataaatg 900
acaagatact atcatatacg gaatcgatgg caggcaaaag agaatggtt atcattacat 960
ttaagagcgg cgcaacattt caggtcgaag tcccgggcag tcaacatata gactoccaaa 1020
aaaaagccat tgaaggatg aaggacacat taagaatcac atatctgacc gagacaaaaa 1080
ttgataaatt atgtgtatgg aataataaaa ccccaattc aattgoggca atcagtatgg 1140
aaaactag
    
```

15

El mutante de LT destoxificado contiene una subunidad A mutada que incluye un residuo mutado en una posición esencial para su actividad de ADP-ribosiltransferasa, por ejemplo, la posición 53, 61, 63, 69, 97, 104, 106, 110 o 112 en la SEQ ID NO:1. Véase la patente de Estados Unidos 6.149.919, US 20081012078, Cieplak et al., J. Biol. Chem. 270(51):30545-30550, 1995; y Cheng et al., Vaccine 18:38-49, 2000. En la mutante de LT, las subunidades A y B forman la estructura típica ABs de holotoxina. En un ejemplo, el mutante de LT destoxificado (LTS61K) contiene una subunidad A mutada que incluye K en la posición 61 en la SEQ ID NO: 1 y una subunidad B de tipo silvestre. En otro ejemplo, el mutante de LT destoxificado (LTS63K) contiene una subunidad A mutada que incluye K en la posición 63 en la SEQ ID NO: 1 y una subunidad B de tipo silvestre.

25

Otros mutantes de LT destoxificadas se divulgan en el documento US2001/0044416, Nawar et al., Infection and Immunity 73(3): 1330-1342 (2005), Komase et al., Vaccine 16(2):248-254, 1993; Magagnoli et al., Infection and Immunity 64(12):5434-5438, 1996; El documento WO99/47164 y la patente de Estados Unidos 6.818.222.

30

Un mutante de LT destoxificada se puede preparar a través de tecnología recombinante convencional. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos que codifican las subunidades A y B de un mutante de LT se pueden insertar en un casete de expresión y expresarse en una célula huésped (por ejemplo, una célula de *E. coli*). Las subunidades A y B pueden autoreensamblarse en la célula huésped para formar una holotoxina, que puede aislarse de la célula huésped mediante, por ejemplo, cromatografía. Véase el documento US20081012078. La toxicidad del mutante de LT preparado de este modo se puede determinar en el ensayo de células suprarrenales Y-1 o en el ensayo de células Caco-2, ambos descritos anteriormente y los que presentan toxicidad sustancialmente reducida se identifican para su uso en el método descrito en el presente documento.

35

Cualquiera de los mutantes de LT destoxificados, ya sea solos o en combinación con uno o más alérgenos, se puede utilizar para el tratamiento de la alergia. Un alérgeno es una sustancia capaz de inducir reacciones alérgicas, es decir, reacciones inmunitarias mediadas por IgE, en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que ha estado

40

expuesto varias veces al mismos. Puede ser cualquier proteína de origen natural, incluyendo alérgenos de polen (de árboles, hierbas, maleza y alérgenos de polen de gramíneas), alérgenos de insectos (alérgenos de inhalación saliva y veneno, tales como alérgenos de ácaros, alérgenos de cucarachas y jejenes, y alérgenos de veneno de himenópteros), alérgenos de pelo y de caspa de animales (de, por ejemplo, perro, gato, caballo, rata, ratón etc.), y alérgenos alimentarios. Los alérgenos de polen importantes de árboles, pastos y hierbas son aquellos que se originan de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y platanaceae, incluyendo abedul (Betula), aliso (Alnus), avellano (Corylus), carpe (Carpinus) y olivo (Olea), cedro (Cryptomeria y Juniperus), árbol del plátano de sombra (Platanus), el orden de Poales, incluyendo hierbas de los géneros Lolium, Phleum, Poa, Cynodon, Dactylis, Holcus, Phalaris, Secale y Sorghum, los órdenes de Asterales y Urticales, incluyendo hierbas de los géneros Ambrosia, Artemisia y Parietaria. Otros alérgenos de inhalación importantes son aquellos que proceden de ácaros del polvo doméstico del género Dermatophagoides y Euroglyphus, ácaros de almacenamiento, por ejemplo Lepidoglyphus, Glycyphagus y Tyrophagus, los de cucarachas, mosquitos y pulgas, por ejemplo Blatella, Periplaneta, Chironomus y Ctenocephalides, y los de mamíferos, tales como de gato, de perro y de caballo, alérgenos de venenos, incluyendo aquellos que se originan a partir de insectos que pican o muerden como los del orden taxonómico de himenópteros, incluyendo abejas (superfamilia Apidae), avispas (superfamilia Vespidae) y hormigas (superfamilia Formicoidae). Importantes alérgenos de inhalación de hongos son, entre otros, los que proceden de los géneros Alternaria y Cladosporium.

Los ejemplos de alérgenos para su uso en el método incluyen, pero no se limitan a los mismos, alérgenos de ácaros del polvo doméstico, polen de gramíneas, polen de árboles y alérgenos alimentarios.

El alérgeno utilizado puede ser una proteína purificada preparada por un método convencional. Como alternativa, puede ser un extracto preparado a partir de una fuente natural de un alérgeno deseado. Normalmente, un extracto de alérgeno contiene una o más isoformas del alérgeno.

El mutante de LT destoxificado o una combinación del mutante de LT y uno o más alérgenos se pueden formular en una composición farmacéutica (por ejemplo, una vacuna), que puede contener además un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato o una solución de bicarbonato. El vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el principio activo de la formulación y, preferentemente, capaz de estabilizar el principio activo y no ser perjudicial para el sujeto que se va a tratar. El vehículo se selecciona sobre la base del modo y la vía de administración, y la práctica farmacéutica estándar. Los vehículos y diluyentes farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para su uso, se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences.

En la técnica, los métodos para preparar vacunas se conocen generalmente bien, como se ilustra en las patentes de Estados Unidos. 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; y 4.596.792. Se pueden preparar vacunas como inyectables, y soluciones líquidas o emulsiones. El mutante de LT descrito en el presente documento o su combinación con un alérgeno puede mezclarse con excipientes fisiológicamente aceptables, que pueden incluir, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos.

La vacuna puede contener además cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o agentes de tamponamiento del pH que potencian la eficacia de las vacunas. Las vacunas pueden administrarse por vía parenteral (por ejemplo, inyección, subcutánea o intramuscular, o administración transcutánea) o por vía mucosa (por ejemplo, por vía intranasal, sublingual u oral). De manera alternativa, pueden ser deseables otros modos de administración, incluyendo supositorios, formulaciones orales o tópicas. Para supositorios, los aglutinantes y vehículos pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir incipientes usados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de sacarina, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos.

La vacuna se administra de forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz, protectora e inmunogénica. En particular, la cantidad del mutante de LT destoxificado en la vacuna debe ser suficiente para reducir las respuestas inmunitarias de tipo Th2. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se va a tratar, que incluyen, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunológico del individuo para sintetizar anticuerpos, y, si es necesario, para producir una respuesta inmunitaria mediada por células. Las cantidades precisas de principio activo requeridas para su administración dependen del juicio del encargado de la práctica. Sin embargo, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los intervalos de dosificación adecuados y pueden ser del orden de microgramos del polipéptido descrito en el presente documento. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables, pero pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores. La dosificación de la vacuna también puede depender de la vía de administración y varía según el tamaño del huésped.

Sin abundar en más detalles, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción anterior, utilizar la presente invención en su extensión más completa. Las siguientes realizaciones específicas deben, por lo tanto, por lo tanto, interpretarse como meramente ilustrativas, y no limitativas del resto de la descripción en modo alguno.

Ejemplo 1: Supresión de respuesta inmunitarias de tipo Th2 en ratones con asma mediante LTS61K solo o en combinación con el alérgeno Der p

En este estudio se usaron ratones BALB/c hembra (6-8 semanas). Estos ratones estaban en condiciones estándar de comida/agua sin patógenos específicos. Se trató a los ratones se trataron siguiendo el protocolo preventivo o terapéutico mostrado en la figura 1.

5 Protocolo preventivo

Se asignó aleatoriamente a los ratones a cuatro grupos, cada uno tratado con (i) solución salina (10 µl por ratón), (ii) *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p de Allergon, 20 µg por ratón), (iii) LT(S61K) (10 µg por ratón), o (iv) LT(S61 K) (10 µg) mezclados con Der p (20 µg), por ratón el día 0, el día 7 y el día 14. Dos semana después, se sensibilizó a os ratones con Der p dos veces (el día 28 y el día 35) y después se sometieron a exposición respiratoria el día 42. Se les sacrificó tres día después.

Se examinó a los ratones tratados de este modo para determinar los niveles de AHR. Más específicamente, los valores de Penh, que representan la resistencia dinámica de las vías respiratorias, se midieron en los ratones tratados con diversas concentraciones de cloruro de acetil-β-metilcolina (metacolina) (Sigma-Aldrich) mediante pletismografía del cuerpo entero sin restricción (Buxco) antes del sacrificio. Como se muestra en la Figura 2, los ratones tratados con LTS61K o la combinación de LTS61K y Der p exhibieron valores de Penh bajos que los tratados con solución salina y Der p. Este resultado indica que LTS61K, ya sea solo o en combinación con alérgeno Der p, redujo el AHR en ratones con asma.

Se recogieron los fluidos del lavado broncoalveolar (BAL) de los ratones. Se contó el número de células totales en los fluidos de BAL después de teñir con azul tripán. Los resultados obtenidos de este modo indican que había menos células presentes en los fluidos de BAL de los ratones tratados con LTS61K y LTS61K/Der p que en los fluidos de BAL de los ratones tratados con solución salina y Der p.

Los niveles de ciertas citocinas, por ejemplo, IL-2, IL-5, TNF-α, eotaxina y TARC, en los fluidos de BAL se determinaron mediante ELISA de tipo sándwich, utilizando kits de análisis de e-Bioscience y R & D DuoSet. No se detectaron diferencias en las citocinas de tipo Th1, tales como IL-2, entre los ratones tratados con LTS61K o LTS61K/Der p y los ratones tratados con solución salina o Der p. Por otro lado, los niveles de las citocinas de tipo Th2, es decir, IL-5, eotaxina y TARC, fueron menores en los ratones tratados con LTS61K- o LTS61K/Der p que en los ratones tratados con solución salina o Der p.

Además, se aislaron los esplenocitos de los ratones tratados y se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/pocillo en cRPMI suplementado con 10 % (v/v) de FBS, piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 50mM, L-glutamina 2 mM, aminoácido no esencial 1 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Los esplenocitos fueron expuestos después a 10 µg de Der p durante de 2 a 3 días y, a continuación, se recogieron los sobrenadantes. Los niveles de IFN-γ, IL-4 e IL- 10 en los sobrenadantes se determinaron usando kits de ELISA de tipo sándwich proporcionados por R&D DuoSet. Además, se sembraron 1×10^5 esplenocitos en un pocillo de una placa de 96 pocillos en presencia de 1 µg de Der p y 0,1 µg o 1 µg de PHA-L (Sigma-Aldrich). La proliferación celular se examinó usando un kit de CCK-8 (Dojindo) 48 o 72 horas más tarde. Aunque no se observaron diferencias en la proliferación de esplenocitos entre los cuatro grupos de ratones, se observó un nivel inferior de ambas citocinas Th1 y Th2 en los ratones tratados con LT (S61K) o LT (S61K)/Der p en comparación con el de los ratones tratados con solución salina.

En conjunto, los resultados tratados anteriormente muestran que LTS61K, ya sea sola o en combinación con Der p, suprimió la TARC y la respuesta inmunitaria de tipo Th2 cuando se administró a ratones con asma siguiendo el protocolo preventivo.

50 Protocolo terapéutico.

En primer lugar, se sensibilizó a los ratones con Der p, que se mezcló con adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma-Aldrich) en un volumen igual, del modo siguiente. Se inyectó a cada ratón por vía intradérmica 40 µg de Der p el día 0 y el día 7 y se inyectó por vía intratraqueal 50 µg de Der p con anestesia ligera mediante Zoletil 50 más Rompun el día 14. Se asignó aleatoriamente a los ratones sensibilizados a cuatro grupos, a cada uno de los cuales se administró por vía intranasal (i) solución salina (10 µl por ratón), (ii) Der p (20 µg por ratón), (iii) LT(S61K) (10 µg por ratón), y (iv) LT(S61 K) (10 µg) mezclados con Der p (20 µg), por ratón con anestesia suave 3 veces los días 16, 18, 20. El día 21, se inyectó a los ratones por vía intratraqueal 50 µg de Der p y se les sacrificó 3 días después (día 24).

AHR y las células totales infiltradas en los BALF se examinaron como se ha descrito anteriormente. Se observó un nivel más bajo de resistencia de las vías respiratorias en los ratones del grupo (ii) y el grupo (iv), en comparación con los ratones del grupo (i) y el grupo (iii). Además, el número de células en los BALF del grupo (iii) y el grupo (iv) ratones eran inferiores a los de los BALF de los ratones del grupo (i) y el grupo (II).

Los niveles de varias citocinas en los BALF se determinaron mediante ELISA de tipo sándwich como se ha descrito anteriormente. Los niveles de citocinas, en particular las citocinas de tipo Th2 IL-5, TARC y eotaxina, fueron

significativamente menores en los BALF de los ratones del grupo (iii) y el grupo (iv), tratados con LTS61K y su combinación con Der p, respectivamente, que en los BALF de los ratones del grupo (i) y el grupo (ii), tratados con solución salina y Der p, respectivamente. Véase la figura 3.

- 5 Se aislaron esplenocitos de los ratones tratados; se determinaron su proliferación y producción de citocinas como se ha descrito anteriormente. No se observaron diferencias significativas en la proliferación de esplenocitos en los cuatro grupos de ratones. Por otra parte, los niveles de IFN- γ , IL-4 e IL-10 fueron significativamente inferiores en los ratones del grupo (iii) y el grupo (iv), en comparación con los ratones del grupo (i) y el grupo (ii).
- 10 En resumen, los resultados tratados anteriormente muestran que LTS61K, ya sea sola o en combinación con Der p, suprimía la TARC y la respuesta inmunitaria de tipo Th2 cuando se administró a ratones con asma siguiendo el protocolo terapéutico en la figura 1.

15 **Ejemplo 2: Inducción local y sistémica de IgA específica de alérgenos en ratones con asma mediante tratamiento intranasal de LTS61K sola o en combinación con Der p**

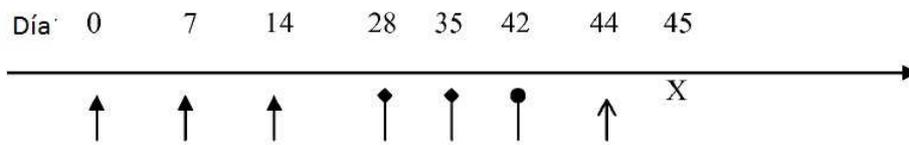
- Se ha publicado que la IgA específica de alérgenos desempeña un papel protector en el asma alérgica. Los niveles de IgA específica de Der-p se examinaron tanto en ratones sometidos al protocolo preventivo como en ratones sometidos al protocolo terapéutico (véase la figura 1) del siguiente modo. Una placa de múltiples pocillos se recubrió con Der p (10 μ g/pocillo) en un tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 15 mM y NaHCO_3 35 mM, p = 9,6) a 4 °C durante la noche y, a continuación, se lavó con PBST (0,05 % de Tween 20 en PBS) y se bloqueó mediante 0,5 % de BSA (Sigma-Aldrich). Las muestras de suero o fluido de BAL de los ratones se diluyeron y se incubaron en la placa recubierta a 4 °C durante la noche. A continuación, se añadieron a la placa anticuerpos de tipo IgA anti-ratón de cabra conjugados con HRP (1:10000, Novus Biologicals). Después de lavar la placa con PBST, se añadió a la
- 20 misma tetrametilbencidina (TMB, Clinical Science Products) para el desarrollo de la señal. Como se muestra en las figuras 4 y 5, la combinación de LTS61K y Der p indujo la producción de IgA anti-Der p en sangre y en BALF en los
- 25 ratones tratados siguiendo el protocolo preventivo o el terapéutico.

REIVINDICACIONES

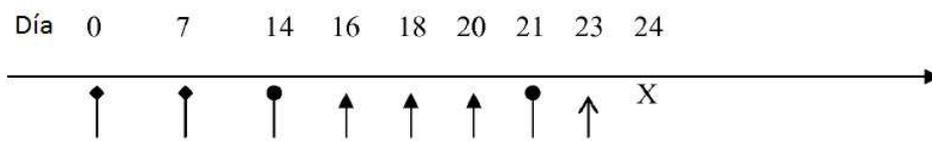
- 5 1. Una enterotoxina termolábil de *E. coli* destoxificada (LT) para su uso en el tratamiento de la alergia en las vías respiratorias en un sujeto mediante administración intranasal de una cantidad eficaz para inducir una respuesta antialérgica en el sujeto, en donde la LT destoxificada es LTS61K, que contiene una subunidad A mutada que contiene una mutación de serina a lisina en la posición correspondiente a la posición 61 en la SEQ ID NO:1 y en donde LTS61K induce la respuesta antialérgica.
- 10 2. La LT destoxificada para su uso de la reivindicación 1, que está formulada en una composición farmacéutica que está libre de alérgenos.
3. La LT destoxificada para su uso de la reivindicación 1, que está formulada en una composición farmacéutica que contiene un alérgeno.
- 15 4. La LT destoxificada para su uso de las reivindicaciones 1, 2, o 3, en donde el sujeto sufre o está en riesgo de sufrir asma.

Fig. 1

Protocolo preventivo :



Protocolo terapéutico:



- ↑ : tratamiento intranasal con (a) solución salina normal (b) Der p (20 µg); (c) LT(S61K) (10 µg); o (d) LT(S61K)/Der p (10 µg/20 µg)
- ◆ : sensibilización e inyección intradérmica de refuerzo de 40 µg de Der p/IFA
- : exposición intratraqueal de las vías respiratorias con 50 µg de Der p
- ↑ : análisis de la hiperreactividad de las vías respiratorias
- x : sacrificio

Fig. 2

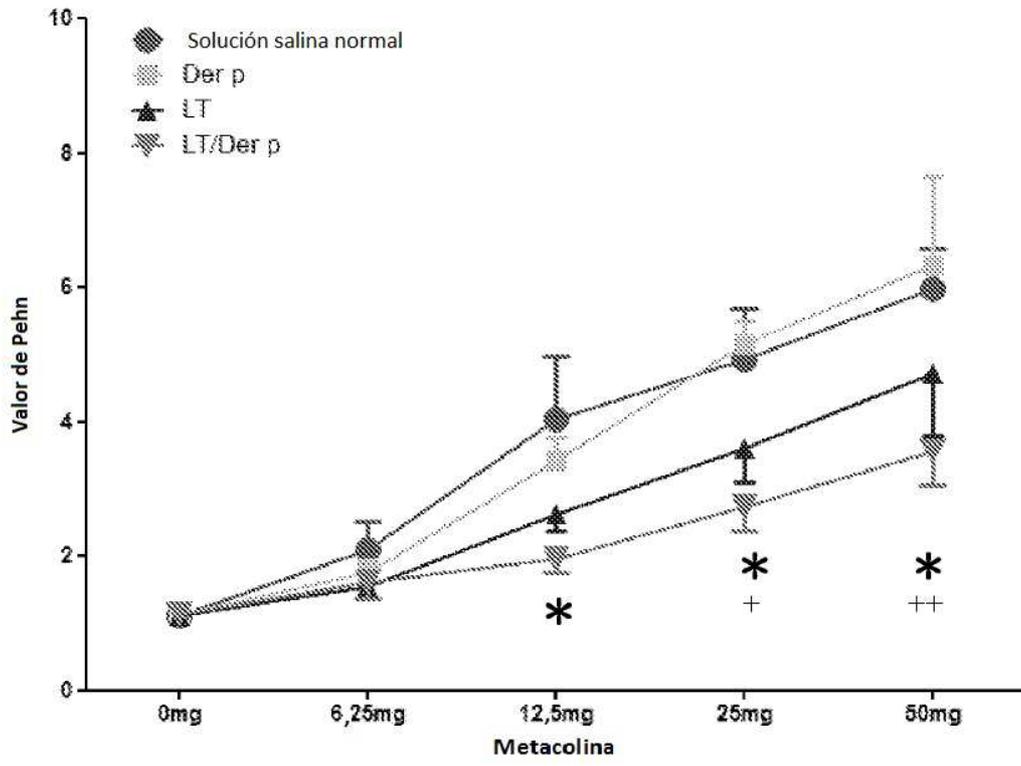
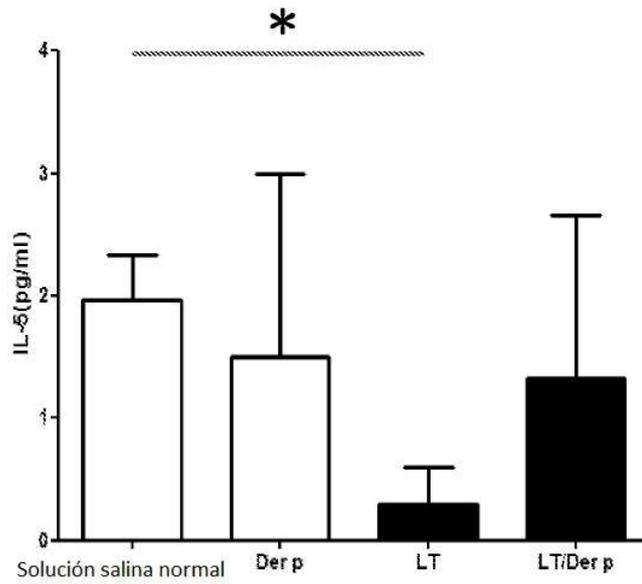


Fig. 3

A. IL-5



B. TNF- α

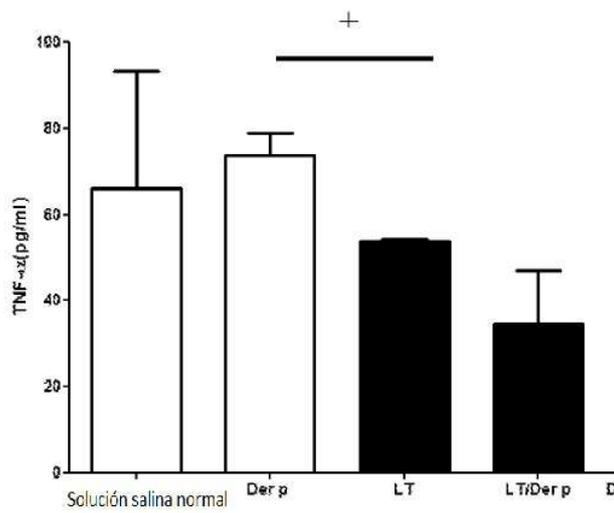
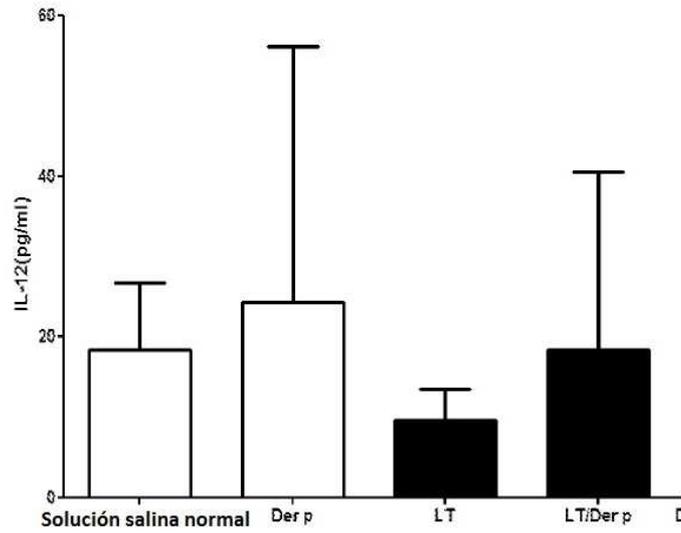
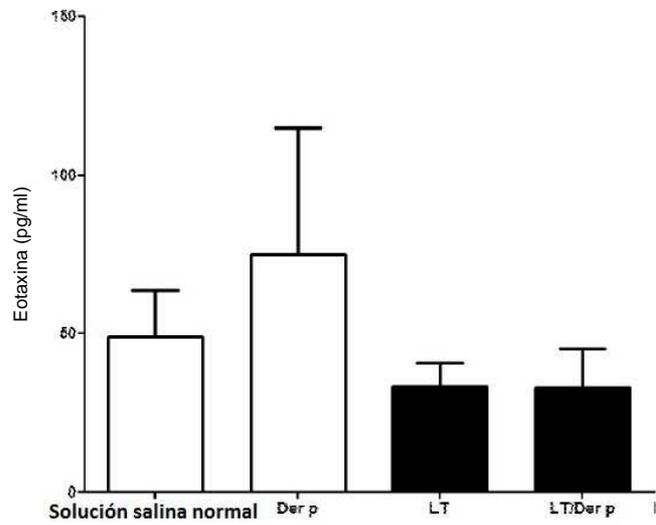


Fig. 3 (Cont.)

C. IL-12



D. Eotaxina



E. TARC

*

*

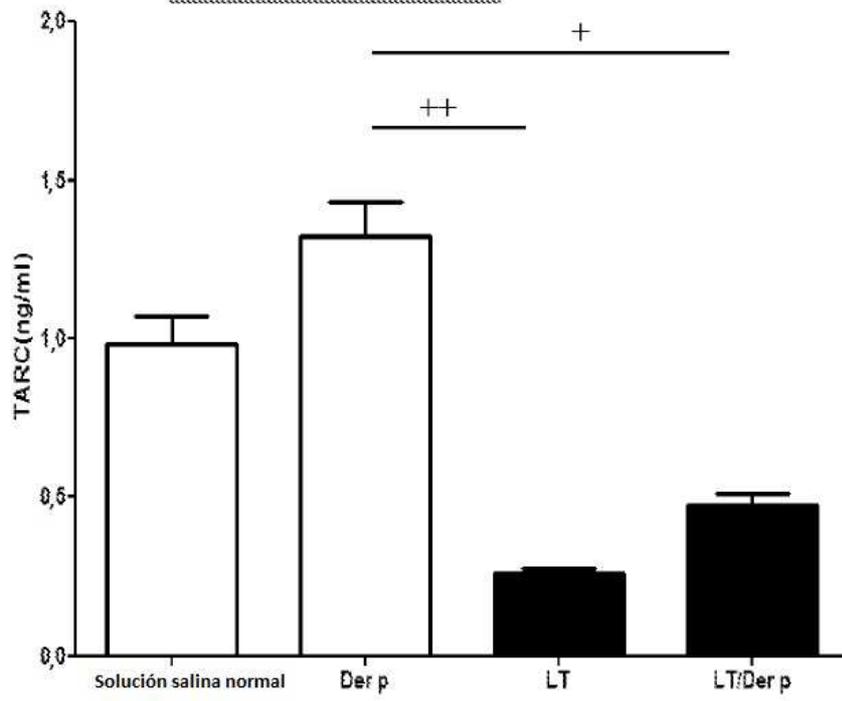


Fig. 4

(a) Suero

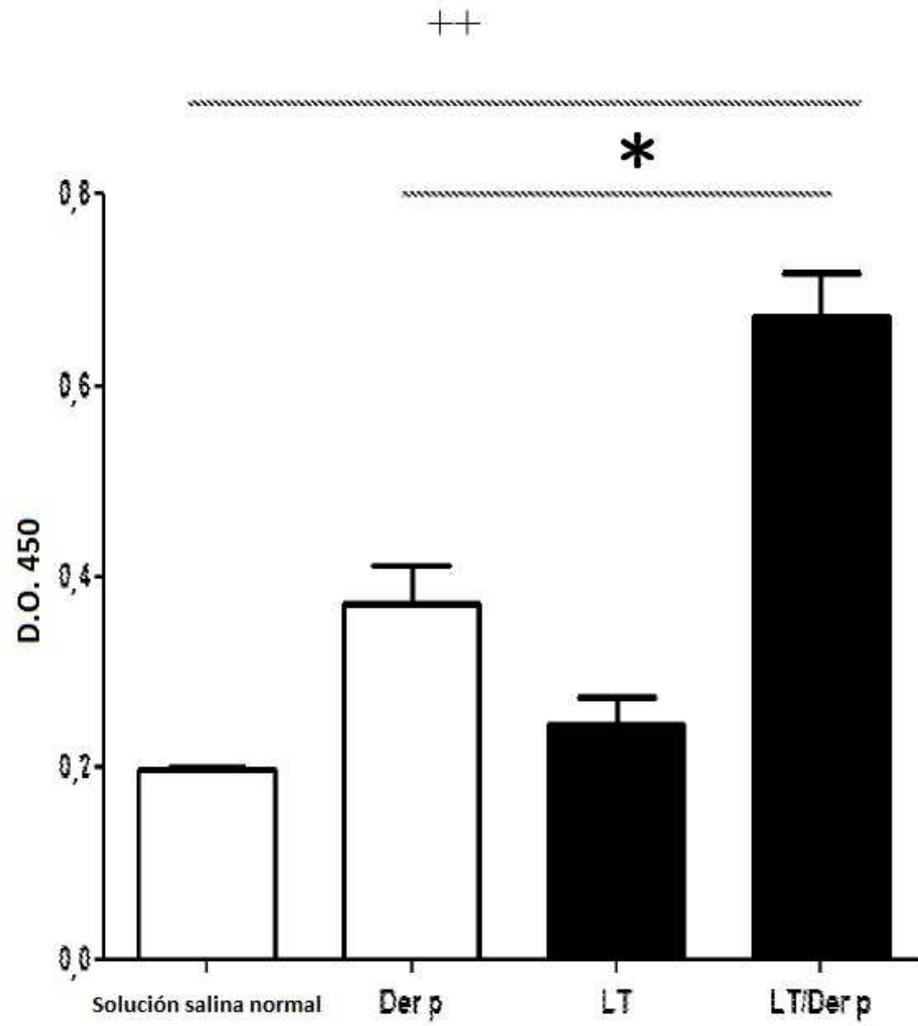


Fig. 4 (Cont.)

(b) Fluido de BAL

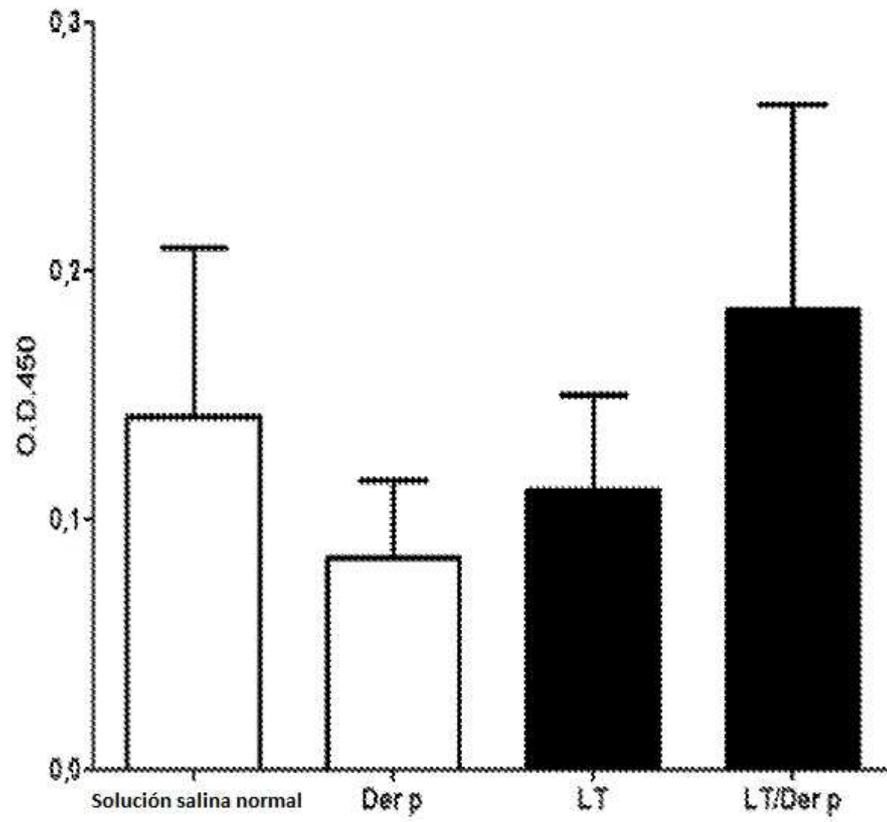


Fig. 5

(a) Suero

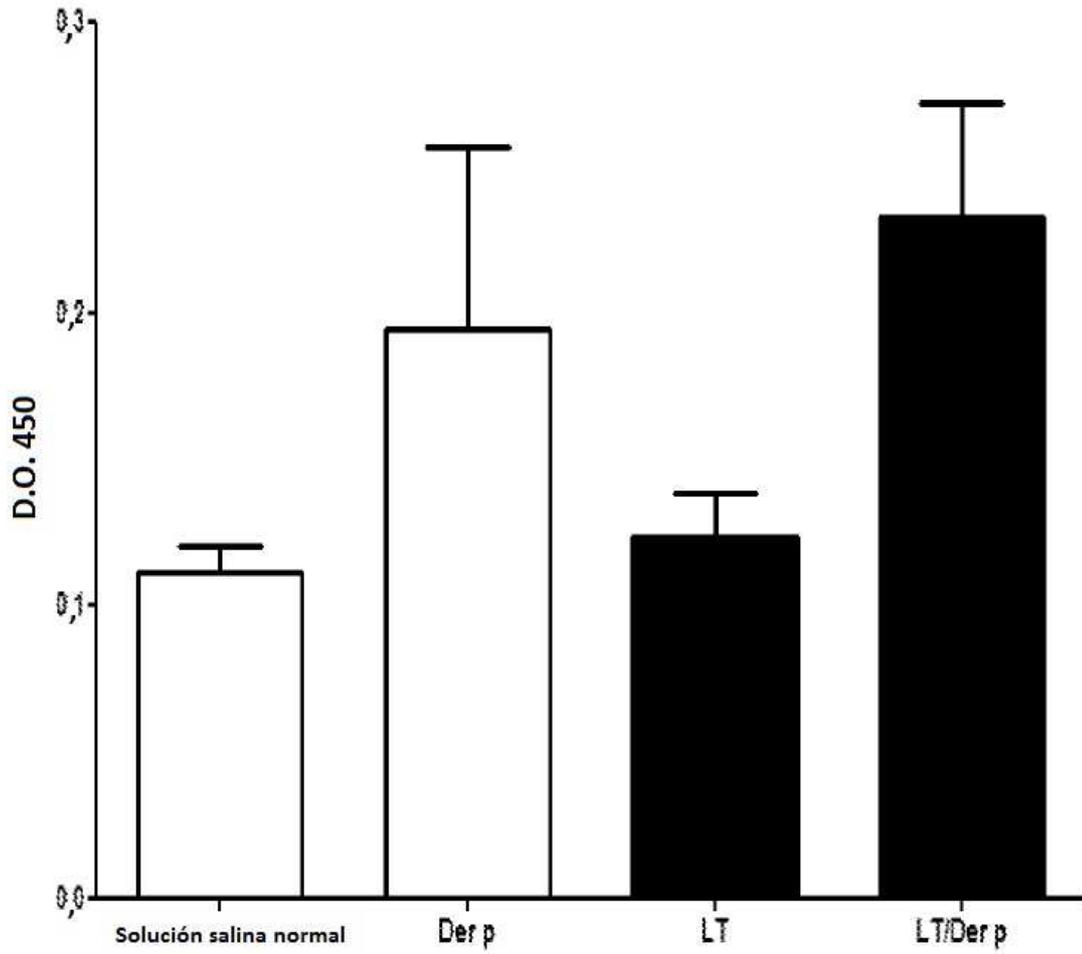


Fig. 5 (Cont.)

(b) Fluido de BAL

