

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 431**

51 Int. Cl.:

C07K 14/245 (2006.01)

A61K 39/108 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2014** **PCT/IB2014/000267**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014** **WO14128555**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014** **E 14711297 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 2958935**

54 Título: **Vacuna**

30 Prioridad:

20.02.2013 US 201361766958 P

20.02.2013 US 201361767161 P

20.02.2013 US 201361850636 P

03.10.2013 US 201361886242 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2020

73 Titular/es:

BERGEN TEKNOLOGIOVERFØRING AS (50.0%)

Thormøhlensgate 51

5006 Bergen, NO y

**THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PUNTERVOLL, PÅL;
SOMMERFELT, HALVOR;
CLEMENTS, JOHN;
NATARO, JAMES, P.;
ZHANG, WEIPING y
TAXT, ARNE, M.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 743 431 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

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas contra *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET). Más específicamente, la presente invención se refiere a mutantes de la enterotoxina termoestable de ECET que resultan adecuados para la utilización como componentes de vacuna.

10 Antecedentes de la invención

La *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) es una bacteria Gram-negativa que es responsable de 280 a 400 millones de episodios de diarrea, y aproximadamente 380.000 muertes al año (Taxt et al., Infect Immun. 78(5):1824-31, mayo de 2010. pub. electrónica 15 de enero, 2010. La mayoría de víctimas son niños de menos de 5 años de edad que viven en países en desarrollo. Además, se considera que la ECET es la causa más común de la diarrea del viajero.

La ECET coloniza el intestino delgado y se transmite mediante la vía fecal-oral. Las bacterias se adhieren al epitelio intestinal mediante factores de colonización (FC) característicos. Los FC son fimbrias o fibrillas: proteínas filamentosas que se presentan sobre la superficie bacteriana. Hasta hoy, se han identificado 25 FC de ECET diferentes (Rivera et al., J. Clin. Microbiol. 48(9): 3198-3203, septiembre 2010).

Se han realizado numerosos intentos para desarrollar una vacuna de ECET, pero no se encuentran disponibles vacunas ampliamente eficaces para proteger al ser humano frente a la diarrea por ECET. Una vacuna de células completas muertas representa el candidato más prometedor hasta hoy (Jertborn et al., Vaccine 16:255-60, 1998; Sack et al., Vaccine 30:25(22):4392-400, mayo 2007; pub. electrónica 4 de abril, 2007). Esta comprende cinco cepas de ECET que se coadministran con subunidad B de la toxina del cólera (TC-B). Se han seleccionado cinco cepas de ECET para proporcionar los FC más comunes.

Las enterotoxinas, conocidas como toxinas termoestables (TE) y termolábiles (TL), además de los FC, son determinantes de virulencia en la diarrea de ECET. Ambas toxinas actúan estimulando la secreción neta de iones y agua por las células epiteliales intestinales. Ello causa diarrea acuosa, que puede conducir a una condición similar al cólera en los casos más extremos.

A principios de los 1980 se identificó la TE como una diana para la vacuna de ECET, aunque, a pesar de muchos esfuerzos, no se ha desarrollado ninguna vacuna basada en TE con éxito.

Subyacen tres problemas principales a la dificultad de utilizar la TE como un componente de vacuna. En primer lugar, el polipéptido TE es inherentemente tóxico. En segundo lugar, en su forma natural, el polipéptido TE no es inmunogénico. Finalmente, la TE es estrechamente similar a los polipéptidos endógenos guanilina y uroguanilina, lo que plantea la posibilidad de que anticuerpos anti-toxina termoestable puedan reaccionar cruzadamente y provocar trastornos autoinmunológicos en los vacunados.

Se ha informado de varios mutantes de TE que reducen la toxicidad (Taxt, A. et al., Infect. Immun. 78, 1824-1831, 2010; Zhang, W. et al. Infection and Immunity, 78(1), 316-325, 2010, documento nºWO99/09416 y Liu, M. et al., Toxins 3, 1146-1162, 2011. Sin embargo, debido a que TE es un polipéptido pequeño, la mayoría de mutantes con toxicidad reducida también presentan una inmunogenicidad reducida.

Taxt et al. (Infection and Immunity, vol. 78, nº 5, 1824-1831, 2010) proporciona una revisión de las propiedades moleculares y biológicas de la TE y comenta estrategias para desarrollar una vacuna de ECET que incorpore derivados de la toxina TE.

El problema de proporcionar un mutante de toxina termoestable que muestre tanto toxicidad reducida como inmunogenicidad específica sigue constituyen un reto significativo. A pesar de los numerosos intentos, no se ha desarrollado ningún componente de vacuna de toxina termoestable con éxito que induzca una respuesta inmunológica neutralizadora y protectora.

Descripción resumida de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar mutantes de toxina termoestable que puedan utilizarse como componentes de vacuna de ECET. Específicamente, se pretende proporcionar mutantes de enterotoxina termoestable (TE) que muestren poca o ninguna toxicidad y sean capaces de inducir una respuesta inmunológica específica neutralizadora al acoplarse con un portador adecuado.

Para resolver este problema, se llevó a cabo un cribado sistemático de la totalidad de 361 posibles mutantes puntuales de la TE humana (TEh). Los mutantes se expresaron con una secuencia de señal para dirigir las proteínas a la

secreción a partir de la célula huésped y se llevó a cabo la expresión utilizando una cepa de laboratorio de *E. coli*. Este modelo experimental mimetiza eficazmente la producción de TE por ECET. La toxicidad de la biblioteca de mutantes de TE se evaluó utilizando sobrenadantes de cultivo filtrados en el ensayo celular de receptor GC-C.

5 Se cribó la antigenicidad como sustituto de la inmunogenicidad. Se evaluó la antigenicidad utilizando un ELISA competitivo de toxinas termoestables para medir el grado en el que los anticuerpos policlonales generados en conejos contra la toxina termoestable de tipo salvaje se unían a las toxinas termoestables mutantes expresadas recombinantemente.

10 Utilizando este enfoque de cribado sistemático, se identificaron mutantes de TE para la utilización en una vacuna de ECET. Dichos mutantes muestran tanto una toxicidad reducida como una antigenicidad conservada/mejorada.

Según un primer aspecto de la invención se proporciona un mutante de una toxina termoestable (TE) de *E. coli* que presenta la secuencia siguiente:

15
 NSSNYCCELCCNPTCTGCT, o
 NSSNYCCESCCNPTCTGCT, o
 NSSNYCCEACCNPTCTGCT.

20 Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un mutante de una toxina termoestable (TE) de *E. coli* que presenta la secuencia siguiente:

25
 NTFYCCELCCNPTCAGCT, o
 NTFYCCECCNPTCAGCT, o
 NTFYCCEACCNPTCAGCT.

En una realización muy preferente, la TE mutante de la invención se acopla con un portador, por ejemplo albúmina de suero bovino.

30 Las TE mutantes pueden acoplarse con proteínas portadoras para crear moléculas con propiedades inmunogénicas mejoradas. Las proteínas portadoras adecuadas son bien conocidas por el experto en la materia. El acoplamiento con una proteína portadora puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, enfoques de conjugación genética y química.

35 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la TE mutante de la invención.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico de la invención.

40 Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una célula huésped que comprende el vector de la invención.

Entre las células huésped de la invención se incluyen células procarióticas y células eucarióticas. Entre las células huésped procarióticas adecuadas se incluyen bacterias, por ejemplo *E. coli*. Entre las células eucarióticas adecuadas se incluyen levaduras, células de insecto (p.ej., células Sf9) y líneas celulares de mamífero.

45 Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende la TE mutante, ácido nucleico o vector de la invención y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una TE mutante, ácido nucleico o vector de la invención para la utilización en el tratamiento o prevención de la infección por *E. coli*.

En la presente memoria se describe además una TE mutante, ácido nucleico o vector de la invención para la utilización en el tratamiento o la prevención de la diarrea del viajero.

55 En la presente memoria se describe además un método para tratar o prevenir la infección por *E. coli*, que comprende administrar una TE mutante, un ácido nucleico o un vector de la invención en un paciente que necesita de los mismos.

Descripción de los dibujos

60 Figura 1. Modelo estructural de TEh. Los aminoácidos están etiquetados y coloreados en un gradiente de escala de grises de extremo N-terminal a extremo C-terminal. Se muestran dos vistas de la estructura, rotadas 180° respecto al eje x una respecto a la otra.

65 Figura 2. Toxicidad de T84 comparada con la antigenicidad de TEh. El gráfico de burbujas muestra los valores de toxicidad de T84 relativos a la mediana para cada posición de aminoácido de TEh (eje horizontal) representados frente a los valores de antigenicidad de TEh relativos a la mediana (eje vertical). Los ejes están en escala logarítmica. El número de mutantes (n) para cada posición que presenta tanto valores de

toxicidad de T84 como de antigenicidad de TEh determinados con éxito se visualiza a partir del tamaño de las burbujas. En el gráfico se representa un número total de 219 mutantes. Las burbujas están codificadas por color según la posición de aminoácido de extremo N-terminal a extremo C-terminal y están etiquetadas. Las líneas de puntos diagonales representan las toxoidicidades: la línea negra representa una toxoidicidad de 1; las líneas grises a la izquierda representan toxoidicidades de 2, 10 y 100, y las líneas grises a la derecha, toxoidicidades de -2, -10 y -100.

Figura 3. Toxicidad de T84 comparada con la antigenicidad de TEh. El gráfico muestra los valores de toxicidad de T84 relativos para cada mutante de TEh (eje horizontal) representado frente a los valores de antigenicidad de TEh relativos (eje vertical). Los ejes están en escala logarítmica. El número de mutantes (n) para cada posición que presenta tanto valores de toxicidad de T84 como de antigenicidad de TEh determinados con éxito fue de 219. Los puntos están codificados por color según la posición de aminoácido de extremo N-terminal a extremo C-terminal y están etiquetados. Las líneas de puntos diagonales representan las toxoidicidades: la línea negra representa una toxoidicidad de 1; las líneas grises a la izquierda representan toxoidicidades de 2, 10 y 100, y las líneas grises a la derecha, toxoidicidades de -2, -10 y -100.

Figura 4. Antigenicidad de TEh respecto a la antigenicidad de TEp. El gráfico de burbujas muestra los valores de antigenicidad de TEp relativos a la mediana para cada posición de aminoácido de TEh (eje horizontal) representados frente a los valores de antigenicidad de TEh relativos a la mediana (eje vertical). Los ejes están en escala logarítmica. El número de mutantes (n) para cada posición que presenta valores de antigenicidad tanto de TEh como de TEp determinados con éxito se visualiza a partir del tamaño de las burbujas. En el gráfico se representa un número total de 160 mutantes. Las burbujas están codificadas por color según la posición de aminoácido de extremo N-terminal a extremo C-terminal y están etiquetadas. Las líneas de puntos diagonales representan la antigenicidad de TEh respecto a la antigenicidad de TEp: la línea negra representa una antigenicidad de TEh igual a la antigenicidad de TEp; las líneas grises a la izquierda representan antigenicidades de TEh incrementadas 2, 10 y 100 veces, y las líneas grises a la derecha, antigenicidades de TEp incrementadas 2, 10 y 100 veces.

Figura 5. Los paneles muestran resultados de experimentos de ELISA competitivos de TEh, TEp, ST:G8 y clon 30. Cada panel muestra datos de tres experimentos independientes en donde las diluciones en serie de los péptidos TEh, TEp, uroguanilina y guanilina se sometieron a ensayo por triplicado. Los puntos representan la media de los tres experimentos y las barras verticales muestran los valores del máximo y del mínimo. El eje vertical representa la capacidad de un péptido de desplazar por competencia la unión del anticuerpo al recubrimiento (B), expresada como porcentaje de la competición máxima (Bmax). El eje horizontal representa la concentración de péptido, en μM .

Figura 6. Antigenicidad de TE:G8 en comparación con la antigenicidad del clon 30. La antigenicidad de TE:G8 relativa a la mediana de cada posición de aminoácido de TEh (eje vertical) se representa gráficamente frente a la antigenicidad del clon 30 relativa a la mediana (eje horizontal). Se representan datos de 235 mutantes de TEh individuales. Las burbujas están codificadas por color según la posición de aminoácido de extremo N-terminal a extremo C-terminal y están etiquetadas. La línea diagonal representa la antigenicidad del clon 30 respecto a la antigenicidad de TE:G8.

Tabla 1. Candidatos a toxoide TEh Todos los candidatos a toxoide que presentaban toxoidicidades de cien o más se muestran en la parte superior de la línea doble y el mejor candidato a toxoide para cada posición que presentaba una toxoidicidad máxima superior a diez se muestra en la parte inferior. Tanto las toxicidades como las antigenicidades son respecto a la TEh nativa. ¹La antigenicidad se encontraba fuera del intervalo cuantitativo del ensayo y se fijó conservadoramente en 2 veces el nivel de tipo salvaje. ²Los mutantes que no mostraban una toxicidad detectable en el ensayo de receptor GC-C de células T84 se fijaron en el límite de detección del ensayo, que era de 0,0014.

Tabla 2. Todos los mutantes de TEh ordenados según toxoidicidad

Descripción detallada de la invención

A continuación, se proporcionan diversas características y realizaciones preferentes de la presente invención mediante ejemplos no limitativos.

La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran comprendidas dentro de las capacidades del experto ordinario en la materia. Tales técnicas se explican en la literatura. Ver, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, volúmenes 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, New York, NY, 1995 y suplementos periódicos; B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons, 1996; J. M. Polak y James O'D. McGee, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press, 1990; M. J. Gait (ed.), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, 1984; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press, 1992. Cada uno de estos textos generales se incorpora como referencia en la presente memoria.

Toxinas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* (ECET)

ECET secreta dos factores de virulencia esenciales: las enterotoxinas termolábiles y/o las termoestables. Ambas toxinas actúan estimulando la secreción neta de iones y agua por las células epiteliales intestinales. Ello causa diarrea acuosa, que puede conducir a una condición similar al cólera en los casos más extremos.

Toxina termolábil

La toxina termolábil de ECET es una oligotoxina de 84 kDa que está relacionada con la toxina del cólera en estructura y mecanismo. Estimula concentraciones incrementadas de AMPc en las células epiteliales intestinales. Ello resulta en una secreción neta de iones cloro y agua, causando diarrea acuosa.

Toxina termoestable

Se han identificado dos toxinas termoestables de ECET diferentes: TEa/STI y TEb/STII. Estas proteínas no están relacionadas estructural, funcional e inmunológicamente. TEa/STI es el objeto de la presente invención y se hace referencia a la misma en la presente memoria como TE.

Los estudios epidemiológicos indican claramente que las cepas de ECET que secretan TE contribuyen más a la carga de enfermedad diarreica en niños de países en desarrollo que las cepas de ECET que sólo producen TE.

Los genes codificantes de proteínas TE de ECET se alojan en plásmidos transmisibles. Las proteínas TE se expresan como pre-propéptidos inmaduros de 72 aminoácidos. Los residuos 1 a 19 del pre-propéptido constituyen un péptido de señal con diana en la proteína inmadura para la secreción a través de la membrana interna mediante la maquinaria Sec. A continuación, se procesa el propéptido en la forma madura con traslocación a través de la membrana externa.

La TE madura es un polipéptido de aproximadamente 2 kDa. Se conocen dos variantes de TE:

1. TEh (también conocida como TEIb y TEaII): un polipéptido de 19 aminoácidos aislado a partir de cepas de ECET infecciosas de seres humanos;
2. TEp (también conocida como TEIa y TEaI): un polipéptido de 18 aminoácidos aislado a partir de ambas cepas de ECET infecciosas de seres humanos y animales.

El polipéptido TEh maduro (correspondiente a los residuos 54 a 72 del pre-propéptido inmaduro) presenta la secuencia de aminoácidos:

NSSNYCCELCCNPACTGCT

El polipéptido TEp maduro (correspondiente a los residuos 55 a 72 del pre-propéptido inmaduro) presenta la secuencia de aminoácidos:

NTFYCCELCCNPACAGCT

Para los fines de la presente invención, a menos que se indique lo contrario, los residuos aminoácidos y mutantes de TE se numeran según las secuencias del polipéptido maduro relevantes.

Ambas variantes de TE son no inmunogénicas en sus formas naturales.

Las TEh y TEp maduras contienen tres enlaces disulfuro intramoleculares dispuestos en un patrón 1-4/2-5/3-6 (la numeración corresponde al orden de los residuos de cisteína en el polipéptido maduro). Se requiere la disulfuro isomerasa periplasmática (DsbA, por sus siglas en inglés) para la formación de enlaces disulfuro.

La TE se une y activa el receptor de la guanilato ciclasa C (GC-C) mediante la mimetización de los ligandos endógenos guanilina y uroguanilina. La unión de TE resulta en concentraciones incrementadas del mensajero intracelular GMP cíclico (GMPc). Ello causa una reducción de la absorción de iones sodio y cloro, y una secreción incrementada de iones bicarbonato y cloruro, que finalmente resulta en diarrea.

Los polipéptidos TE de ECET son estructuralmente similares a tanto guanilina como uroguanilina. Tanto guanilina como uroguanilina contienen sólo dos enlaces disulfuro y se interconvierten en dos conformaciones diferentes. Los tres enlaces disulfuro de TE aparentemente bloquean el polipéptido TE en una conformación que es similar a la conformación activa de la guanilina y la uroguanilina. Los dos enlaces disulfuro de TE que son comunes en la guanilina y uroguanilina resultan esenciales para la actividad. La mutación de cualquier cisteína de la TE que corresponde a uno de dichos enlaces disulfuro anula o reduce drásticamente la toxicidad.

La sección de TE entre la primera y última cisteínas se denomina dominio tóxico.

Mutantes de toxina termoestable de ECET

En la presente memoria se describe un mutante de una toxina termoestable (TE) de *E. coli* que comprende la secuencia de tipo salvaje siguiente:

5 NSSNYCCELCCNPACTGCT

en la que el mutante comprende una mutación mostrada en la Tabla 1 o en la Tabla 2.

10 La presente invención proporciona un mutante de una toxina termoestable (TE) de *E. coli* que comprende la secuencia de tipo salvaje siguiente:

NSSNYCCELCCNPACTGCT

15 en la que el mutante comprende una mutación A14T. De acuerdo con lo anterior, el mutante presenta la secuencia siguiente:

NSSNYCCELCCNPCTCTGCT.

20 La presente invención proporciona además un mutante de una toxina termoestable (TE) de *E. coli* que comprende la secuencia de tipo salvaje siguiente:

NSSNYCCELCCNPACTGCT

25 en la que el mutante comprende una mutación A14T y una mutación L9S, o una mutación A14T y una mutación L9A. Tales mutantes presentan la secuencia siguiente:

NSSNYCCESCCNPCTCTGCT, o
NSSNYCCEACCNPTCTGCT.

30 La presente invención proporciona además un mutante de una toxina termoestable (TE) de *E. coli* que presenta la secuencia de tipo salvaje siguiente:

NTFYCCELCCNPACAGCT

35 en la que el mutante comprende una mutación A13T. De acuerdo con lo anterior, el mutante presenta la secuencia siguiente:

NTFYCCELCCNPCTCAGCT.

40 La presente invención proporciona además un mutante de una toxina termoestable (TE) de *E. coli* que presenta la secuencia de tipo salvaje siguiente:

NTFYCCELCCNPACAGCT

45 en la que el mutante comprende una mutación A13T y una mutación L8S, o una mutación A13T y una mutación L8A. Tales mutantes presentan la secuencia siguiente:

NTFYCCESCCNPCTCAGCT, o
NTFYCCEACCNPTCAGCT.

50 Los mutantes de la presente invención pueden prepararse mediante métodos bien conocidos de la técnica. Diversas técnicas para la síntesis química de péptidos se revisan en Borgia y

Fields, TibTech 18: 243-251, 2000, y se describen en detalle en las referencias contenidas en la referencia.

55 Conjugados/Portadores

La presente invención proporciona además conjugados en los que un mutante de la presente invención se acopla con un portador.

60 Los portadores de la presente invención pueden resultar útiles para incrementar la inmunogenicidad de TE. Numerosos portadores son conocidos de la técnica.

65 Entre los portadores adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, inmunoglobulina G (IgG), albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), subunidad A de la enterotoxina termolábil (TL-A), subunidad B de la enterotoxina termolábil (TL-B), subunidad B de la toxina del cólera (TC-B), proteína OmpC de la membrana externa,

fragmento ZZ de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, la subunidad mayor ClpG de la fimbria CS31A de *E. coli*, flagelina de *Salmonella* y proteína fluorescente verde (PFV).

5 La conjugación con determinados portadores, por ejemplo TL-B y TE-B pueden proporcionar ventajosamente protección inmunológica contra TE y TL de ECET.

Se encuentra contemplado que el acoplamiento pueda llevarse a cabo mediante un abanico de técnicas conocidas, incluyendo la conjugación química, la fusión genética o la síntesis directa de proteínas.

10 Los enfoques de conjugación química incluyen el acoplamiento de proteínas preformadas mediante la utilización de un agente de entrecruzamiento.

15 La fusión genética incluye el enfoque de unir un mutante de la presente invención a un portador mediante el esqueleto polipeptídico de cada proteína para crear una proteína de fusión. Esta puede llevarse a cabo mediante la expresión de un gen codificante de dicha proteína de fusión. Las proteínas pueden acoplarse con el extremo N-terminal o C-terminal de cualquiera de las proteínas. Alternativamente, puede insertarse una proteína en otra proteína de manera que las estructuras y funciones de ambas proteínas no resulten sustancialmente alteradas, por ejemplo mediante incorporación en una región de bucle. Las proteínas pueden acoplarse directamente o mediante conectores polipeptídicos.

20 Finalmente, vectores de vacuna vivos pueden expresar los mutantes, tales como cepas atenuadas de *Shigella* (Altboum et al., Infect Immun. 71(3):1352-60, marzo de 2003).

Variantes, derivados y fragmentos peptídicos

25 En la presente memoria se describen variantes y derivados de las proteínas TE mutantes dadas a conocer en la presente memoria.

30 Los términos "variante" o "derivado" en relación a secuencias de aminoácidos de la presente invención incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, sustitución, delección o adición de uno (o más) aminoácidos de la secuencia o a la secuencia, con la condición de que la secuencia de aminoácidos resultante preferentemente presente sustancialmente la misma actividad terapéutica.

35 Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir la utilización de análogos no naturales, por ejemplo para incrementar la semivida en plasma sanguíneo de un polipéptido administrado terapéuticamente.

40 Pueden realizarse sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la tabla a continuación. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre ellos.

ALIFÁTICOS	No polares	G A P I L V
	Polares - sin carga	C S T M N Q
	Polares - con carga	D E K R H
	AROMÁTICOS	F W Y

Polinucleótidos, vectores y células huésped

45 La presente invención proporciona además polinucleótidos codificantes de mutantes de la toxina termoestable de *E. coli* de la invención.

50 El experto en la materia entenderá que numerosos polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como consecuencia de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que el experto en la materia puede, utilizando técnicas rutinarias, realizar sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos de la invención a fin de reflejar el uso de los codones de cualquier organismo huésped particular en el que deben expresarse los polipéptidos de la invención.

55 Los polinucleótidos de la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. También pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de los mismos nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen de la técnica varios tipos diferentes de modificación de los oligonucleótidos. Entre ellos se incluyen esqueletos metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, debe entenderse que los polinucleótidos indicados en la presente memoria pueden modificarse mediante cualquier método disponible en el campo de la invención.

Tales modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de potenciar la actividad *in vivo* o periodo de vida de los polinucleótidos.

- 5 Los polinucleótidos de la invención pueden incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible.

10 Preferentemente, un polinucleótido de la invención en un vector está operablemente ligado a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. La expresión "operablemente ligado" se refiere a que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera que se pretende. Una secuencia reguladora "ligada operablemente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que se lleva a cabo la expresión de la secuencia codificante bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

15 Entre las secuencias de control operablemente ligadas a secuencias codificantes del mutante de la invención se incluyen promotores/intensificadores y otras señales de regulación de la expresión. Estas secuencias de control pueden seleccionarse para ser compatibles con la célula huésped para la que está diseñada la utilización del vector de expresión. El término "promotor" es bien conocido de la técnica y comprende regiones de ácidos nucleicos de tamaño y complejidad comprendidos entre promotores mínimos y promotores que incluyen elementos e intensificadores situados cadena arriba.

20 Los vectores de la invención pueden transformarse o transfectarse en una célula huésped adecuada de manera que proporcionen la expresión de una LE mutante de la invención. Este procedimiento puede comprender cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión tal como se ha indicado anteriormente bajo condiciones que proporcionan la expresión por el vector de una secuencia codificante que codifica el mutante, y recuperar opcionalmente la proteína expresada.

25 El polinucleótido o vector de la invención puede administrarse en un sujeto de manera que el péptido TE mutante se exprese *in vivo*. Entre los ejemplos de dichos vectores se incluyen, por ejemplo, plásmidos y vectores víricos.

30 Entre los ejemplos de vectores víricos se incluyen vectores retrovíricos, vectores del virus de la leucemia murina (VLM), vectores adenovíricos, vectores poxvíricos y vectores de virus Vaccinia. Entre los ejemplos de vectores retrovíricos se incluyen el virus de la leucemia murina (VLM), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), el virus del tumor mamario de ratón (VTMR), el virus del sarcoma de Rous (VSR), el virus del sarcoma de Fujinami (VSFu), el virus de la leucemia murina de Moloney (VLM-Mo), el virus del osteosarcoma murino FBR (VSM FBR), el virus del sarcoma murino de Moloney (VSM-Mo), el virus de la leucemia murina de Abelson (VLM-A), el virus 29 de la mielocitomatosis aviar (MC29) y virus de la eritroblastosis aviar (VEA) y todos los demás *Retroviridae*, incluyendo los lentivirus. Puede encontrarse una lista detallada de retrovirus en Coffin et al., "Retroviruses", Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, páginas 758-763, 1997.

Anticuerpos

45 En la presente memoria se describe un anticuerpo policlonal o monoclonal que es inmunoespecífico para un mutante de TE dado a conocer en la presente memoria.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos, incluyendo los fragmentos bien caracterizados que se producen mediante digestión con diversas peptidasas. Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, el experto en la materia apreciará que puede sintetizarse fragmentos de anticuerpo *de novo* químicamente o mediante la utilización de metodología de ADN recombinante. De esta manera, el término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye además fragmentos de anticuerpo que conservan su actividad de unión para un antígeno diana, producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante. Entre los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la utilización del término "anticuerpo" se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los fragmentos Fab, Fab', F (ab')₂, Fv, scFv, diacuerpo dsFv y Fd. Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados.

60 Los TE mutantes según la invención pueden utilizarse directamente como inmunógenos para generar antisueros y anticuerpos monoclonales. De esta manera, la exposición proporciona un método para inducir la producción de inmunoglobulinas específicas de antígeno, que comprende las etapas de:

- 65 a) inmunizar un animal o ser humano con un mutante según la presente invención, y
b) recuperar una o más inmunoglobulinas específicas de una región del mutante a partir del suero del animal.

Los animales utilizados para la producción de anticuerpos pueden ser cualesquiera animales utilizados normalmente para el propósito, en particular mamíferos. Están especialmente indicados los ratones, ratas, cobayas y conejos.

- 5 La inmunización se lleva a cabo según técnicas establecidas (ver "Antibodies, A Laboratory Manual", de E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor, EE.UU., 1988).

Más particularmente, el mutante de la presente invención puede utilizarse para producir tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales.

- 10 En el caso de que se deseen anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (p.ej., ratón, conejo, cabra, caballo, etc.). Se recoge suero del animal inmunizado y se trata de acuerdo con procedimientos conocidos. En el caso de que el suero contenga anticuerpos policlonales contra otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse mediante cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar antisueros policlonales son conocidas de la técnica.

- 15 Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos utilizados en la invención también pueden ser producidos fácilmente por el experto en la materia. La metodología general para producir anticuerpos monoclonales por hibridomas es bien conocida. Pueden crearse líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales mediante la fusión celular y también mediante otras técnicas, tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico o la transfección con virus de Epstein-Barr. Pueden cribarse paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra antígenos para diversas propiedades, por ejemplo para isotipo y afinidad de epítopos.

- 20 Una técnica alternativa implica el cribado de bibliotecas de expresión fágica en el que, por ejemplo, el fago expresa fragmentos scFv sobre la superficie de su cubierta con una gran diversidad de regiones determinantes de complementariedad (RDC). Esta técnica es bien conocida de la técnica.

- 25 Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que están dirigidos contra antígenos resultan particularmente útiles en el diagnóstico y los que son neutralizadores resultan útiles en la inmunoterapia pasiva. En particular, pueden utilizarse anticuerpos monoclonales para generar anticuerpos antiidiotípicos. Los anticuerpos antiidiotípicos son inmunoglobulinas que portan una "imagen interna" del antígeno del agente infeccioso contra el que se desea protección.

- 30 Las técnicas para generar anticuerpos antiidiotípicos son conocidas de la técnica. Estos anticuerpos antiidiotípicos también pueden resultar útiles para el tratamiento, así como para elucidar las regiones inmunogénicas de los antígenos.

Composiciones de vacuna

- 35 La presente invención proporciona además una composición de vacuna que comprende una TE mutante o ácido nucleico de la invención y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 40 La preparación de vacunas que contienen uno o más polipéptidos/polinucleótidos inmunogénicos como ingredientes activos es conocida por el experto en la materia. Típicamente, tales vacunas se preparan como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en un líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsificarse o la proteína puede encapsularse en liposomas. Los ingredientes inmunogénicos activos con frecuencia se mezclan con excipientes que resultan farmacéuticamente aceptables y son compatibles con el ingrediente activo. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos.

- 45 Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes tamponadores del pH, y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna.

- 50 Un adyuvante es cualquier sustancia farmacológicamente aceptable que potencia la respuesta inmunológica a un antígeno o alérgeno. De esta manera, un adyuvante inductor de T_H1 potencia la respuesta de las células T_H1 a un antígeno o alérgeno.

- 55 Entre los ejemplos de adyuvantes que pueden resultar eficaces se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, hidróxido de aluminio, tirosina y derivados de los mismos, N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (Thr-MDP), N-acetil-nor-muramilo-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias: monofosforil-lípido A, trehalosa dimicolato y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween 80.

- 60 Entre los ejemplos adicionales de adyuvantes y otros agentes se incluyen fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio (alúmina), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbono, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, dipéptido muramilo, endotoxina bacteriana, lípido X, *Corynebacterium parvum* (*Propionobacterium acnes*),

Bordetella pertussis, polirribonucleótidos, alginato sódico, lanolina, lisolecitina, vitamina A, saponina, liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros bloqueados u otros adyuvantes sintéticos. Tales adyuvantes se encuentran disponibles comercialmente de diversas fuentes por ejemplo Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) o adyuvante incompleto y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

5 Típicamente, se utilizan adyuvantes tales como Amphigen (aceite-en-agua), Alhydrogel (hidróxido de aluminio), una mezcla de Amphigen y Alhydrogel, tirosina y derivados de la misma, y fosfato de calcio.

10 Pueden utilizarse adyuvantes que interactúan con receptores de tipo Toll sobre células fagocíticas, y endocitos y/o células presentadoras de antígenos, por ejemplo, aunque sin limitación, receptores de tipo Toll 2 y/o 4 y/o 9. Son ejemplos de dichos adyuvantes, aunque sin limitación, el adyuvante monofosforil-lípido A (MPL, por sus siglas en inglés) inductor de Th1 (ver las patentes US nº 4.912.094 y nº 4.987.237), y sus derivados y análogos sintéticos, y el motivo de ADN CpG y sus derivados y análogos.

15 La proporción de inmunógeno y adyuvante puede modificarse en un amplio intervalo, con la condición de que ambos se encuentren presentes en cantidades eficaces. Por ejemplo, puede encontrarse presente hidróxido de aluminio en una cantidad de aproximadamente 0,5% de la mezcla de vacuna (base Al_2O_3).

20 La eficacia de un adyuvante puede determinarse mediante la medición de la cantidad de anticuerpos dirigidos contra un agente inmunogénico que resulta de la administración de este agente en vacunas que también comprenden diversos adyuvantes.

25 Las vacunas convencionalmente se administran por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Entre las formulaciones adicionales que resultan adecuadas para otros modos de administración se incluyen supositorios y formulaciones orales.

Para los supositorios, los ligantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos.

30 Entre las formulaciones orales se incluyen tales excipientes utilizados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, bicarbonato sódico, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones o polvos de liberación sostenida, y pueden contener, por ejemplo, 10% a 95% de ingrediente activo, preferentemente 25% a 70%. En el caso de que se liofilice la composición de vacuna, el material liofilizado puede reconstituirse antes de la administración, por ejemplo en forma de una suspensión. La reconstitución preferentemente se lleva a cabo en tampón.

Dosificación y administración de vacunas

40 Las vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de dosis, y en tales cantidades que resulten profiláctica y/o terapéuticamente eficaces.

45 Una vacuna profiláctica es una que evita enfermedades. La cantidad que debe administrarse puede depender del sujeto que debe tratarse y de la capacidad del sistema inmunológico del sujeto de sintetizar anticuerpos.

Las cantidades precisas de ingrediente activo que se requiere administrar pueden depender del criterio del médico y pueden ser particulares de cada sujeto.

50 La vacuna puede proporcionarse en un programa de una sola dosis o en un programa de múltiples dosis. Un programa de múltiples dosis es uno en el que un curso primario de vacunación puede ser de 1 a 10 dosis separadas seguido de otras dosis proporcionadas en intervalos de tiempo posteriores requeridos para mantener y/o reforzar la respuesta inmunológica, por ejemplo 2 a 4 semanas después de la primera dosis, y en caso necesario, una o más dosis posteriores después de varios meses. El régimen de dosis también se determinará, por lo menos en parte, por la necesidad del individuo y será dependiente del criterio del médico.

55 Además, la vacuna que contiene el antígeno o antígenos puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores, por ejemplo inmunoglobulinas.

60 Debe apreciarse que entre todas las referencias en la presente memoria a tratamiento se incluye el tratamiento curativo, paliativo y profiláctico. El tratamiento de los mamíferos resulta particularmente preferente. Los tratamientos tanto humanos como veterinarios se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Métodos de cribado de mutantes

65 En la presente memoria se describe un método para cribar mutantes de una toxina termoestable de *E. coli* que

presenta una toxicidad reducida y una antigenicidad específica conservada o incrementada y, según se espera, para la inmunogenicidad de algunos mutantes.

El método se refiere al análisis de una biblioteca de mutantes de una toxina termoestable de *E. coli* para toxoidicidad. El término "toxoides" se define como un mutante de TE que muestra una toxicidad nula o muy baja, y que es capaz de inducir una respuesta inmunológica específica de TE eficaz al acoplarla con un portador adecuado.

El método incluye métodos de cribado de mutantes de una toxina termoestable de *E. coli* que se encuentran presentes en filtrados de cultivo. Un reto al medir la toxicidad en filtrados de cultivo es que es un producto de toxicidad intrínseca (toxicidad por mol) y la concentración del mutante de TE. Lo mismo es cierto para la antigenicidad. Por lo tanto, una reducción de la toxicidad o antigenicidad, en comparación con la TE nativa, puede deberse a una concentración de TE más baja, una reducción de la toxicidad/antigenicidad intrínseca, o una combinación de las dos. La medición exacta de la concentración de mutante de TE en filtrados de cultivo constituye un reto.

La primera etapa para evitar el problema de medir la toxicidad y antigenicidad intrínsecas es medir la toxicidad y antigenicidad de los mutantes de TE en el mismo sobrenadante y respecto a la TE nativa. Ello nos permite describir los cambios de toxicidad y antigenicidad en filtrados de cultivo de mutante. La segunda etapa es dividir a continuación el cambio de antigenicidad por el cambio de toxicidad para cada mutante. En el caso de que se haya utilizado el mismo filtrado de cultivo para medir la toxicidad y la antigenicidad, ello nos permite eliminar los efectos de la concentración. Esta medida se define como "toxoidicidad":

$$\text{toxoidicidad} = \frac{A_r}{T_r} = \frac{A_i \times c}{T_i \times c} = \frac{A_i}{T_i}$$

en la que *c* es la concentración, *A_r* es la antigenicidad relativa del filtrado de cultivo, *T_r* es la toxicidad relativa del filtrado de cultivo, *A_i* es la antigenicidad intrínseca y *T_i* es la toxicidad intrínseca. Los buenos candidatos a toxoides presentarán una toxoidicidad elevada.

Puede incorporarse una biblioteca de mutantes de un gen de TE en un vector de expresión adecuado, creado mediante cualquiera de los métodos bien conocidos de la técnica. Entre tales métodos se incluye la mutagénesis dirigida a sitio, la mutagénesis aleatoria y la síntesis de ADN *de novo*.

Las proteínas codificadas por la biblioteca pueden producirse mediante incorporación de los vectores en células huésped adecuadas, cultivo de las células huésped bajo condiciones que permiten la expresión de los mutantes por la célula huésped y el aislamiento de las proteínas mutantes. Se conocen de la técnica numerosos vectores y células huésped, tal como se ha indicado anteriormente, y el experto en la materia podrá seleccionar fácilmente vectores y células huésped adecuados. Las células huésped preferentes para la presente invención son las células huésped procaríóticas, particularmente *E. coli*. Es una característica preferente de la invención la construcción de la biblioteca mutante y la realización de la expresión de manera que las proteínas mutantes se secreten a partir de las células huésped al medio de cultivo. Lo anterior puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante incorporación de una secuencia de señal de secreción que se liga operablemente al gen en el vector de expresión.

Los mutantes que muestran una toxicidad reducida y una inmunogenicidad específica incrementada (es decir, candidatos a toxoides) pueden determinarse llevando a cabo ensayos de toxicidad y antigenicidad en las proteínas expresadas de la biblioteca de mutantes. Pueden identificarse candidatos a toxoides mediante el cálculo de la toxoidicidad tal como se ha definido anteriormente.

Entre los ensayos adecuados para analizar la toxicidad de los mutantes de TE se incluyen el ensayo celular de receptor GC-C (PMID:2892417; Guarino et al., Am J Physiol. 253(6 Pt 1):G775-80, dic., 1987), el ensayo de ratón lactante (PMID:780280; Giannella, Infect Immun. 14(1):95-9, julio, 1976) y el ensayo de asa intestinal ligada (PMID:7030964; Klipstein et al., Infect Immun. 34(2):637-9, nov, 1981). Estos métodos son bien conocidos de la técnica.

El ensayo directamente de la inmunogenicidad de un mutante requeriría purificar todos los posibles mutantes y acoplar individualmente las proteínas purificadas a las proteínas portadoras. Ello no resulta viable para bibliotecas grandes. Como alternativa, resulta posible cribar la antigenicidad como variable sustitutiva de la inmunogenicidad. Entre los ensayos adecuados para determinar la antigenicidad se incluyen los métodos basados en ELIAS, por ejemplo los métodos de ELISA competitivo. En una realización, se evaluó la antigenicidad utilizando un ELISA competitivo de toxinas termoestables para medir la afinidad de los anticuerpos generados contra la toxina termoestable de tipo salvaje para las toxinas termoestables mutantes expresadas recombinantemente.

Ejemplos

Métodos

Generación y expresión de biblioteca de mutante de TE

Se clonó el gen *sta3* de la cepa enterotoxigénica H10407 de *E. coli*, codificante de TE_h, en el vector pBAD-TOPO (Invitrogen). El vector pBAD-ST_h resultante contiene el promotor araBAD, que permite la expresión ajustable mediante la inducción con arabinosa al 0,000002% a 0,2%. La TE madura se libera al sobrenadante de cultivo al inducir las células a niveles de arabinosa superiores a 0,002%. Se consiguió una expresión óptima con arabinosa al 0,2%.

Se expresó la biblioteca de mutantes de TE en lotes de 19 mutantes de TE, incluyendo 3 cultivos de TE de tipo salvaje a modo de controles. Los sobrenadantes de cultivo se aislaron mediante centrifugación y después se filtraron (filtro de 0,2 µm). Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C.

ELISA competitivo de TE

Se llevó a cabo un ELISA de TE_h competitivo tal como se ha descrito anteriormente (MID: 6520401; Lockwood y Robertson, J. Immunol. Methods. 75(2):295-307, 31 de dic., 1984) con modificaciones menores. Se recubrió una placa de microtitulación en forma de U (Linbro, Fisher Scientific, Göteborg, Suecia) con conjugado de TE_h-ovoalbúmina diluido en tampón de ELISA (NaCl 128 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 8,10 mM; pH 7,0-7,2). La placa se cubrió con un sellador de placa y se incubó durante la noche a 37°C. El contenido de los pocillos se descartó mediante inversión. Se bloquearon sitios de unión adicionales en la proteína mediante incubación con ovoalbúmina al 1% (p/v) (Sigma-Aldrich) diluida en tampón de ELISA. Tras la incubación durante 1 h a 37°C, se vaciaron los pocillos y se lavaron tres veces con tampón de lavado (tampón de ELISA que contenía ovoalbúmina al 0,05% (p/v) y Tween-20 al 0,05% (v/v)). Se añadieron 75 µl de muestras que contenían TE_h y 75 µl de antiseros diluidos (anti-TE_a de conejo purificado con proteína A, suministrado por John D. Clements; Department of Microbiology and Immunology, Tulane University, New Orleans, EE.UU.). Ambas diluciones se llevaron a cabo en tampón ELISA que contenía ovoalbúmina al 0,05% (p/v). Se determinaron las diluciones y concentraciones apropiadas de los reactivos mediante titulaciones en damero. La placa se incubó durante 2 h a 37°C en un agitador-incubador rotatorio (Infors HT, Bottmingen/Basel, Suiza) a 180 rpm. Se vaciaron los pocillos y se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de conjugado de IgG anticonejo-fosfatasa alcalina producida en cabra (Sigma-Aldrich) diluidos 1:400 en tampón de ELISA con ovoalbúmina al 0,05% (p/v) y se incubaron sin agitación durante 1 h a 37°C. Se vaciaron los pocillos y se lavaron tres veces con tampón de lavado, seguido de la adición de 100 µl de hexahidrato de sal disódica de 4-nitrofenilfosfato a una concentración de 1 mg/ml en tampón de dietanolamina (dietanolamina al 9,7% (v/v), MgCl₂ x 6H₂O 0,49 mM; pH 9,8). Tras la incubación durante 30 min, se detuvo la reacción con 50 µl de NaOH 2 N (VWR International) en cada pocillo. Se leyó la absorbancia en un lector automático de placas a 405 nm (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech, Alemania). Todas las muestras se midieron por triplicado.

Ensayo en célula T-84 de receptor GC-C

Se sembraron células T-84 y se cultivaron en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Tras eliminar el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM:F12 (1:1) Lonza Walkersville, Inc.), las células se lavaron 3 veces con 0,5 ml de DMEM. Las células se incubaron con 0,25 ml de DMEM que contenía 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM (IBMX) durante 10 min a 37°C. Se añadieron 0,1 ml de muestra (filtrado de cultivo) a cada pocillo y se incubaron durante 60 min a 37°C. Tras la incubación, se aspiró el medio de reacción y se lisaron las células con HCl 0,1 mM a temperatura ambiente durante 20 min. Los lisados se centrifugaron a velocidad máxima durante 10 min y se midieron los niveles de GMPc en células de control estimuladas con agonista utilizando un kit de inmunoensayo directo de enzima de GMPc (Enzo Life Sciences, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El filtrado de cultivo de cada mutante se añadió a las células T-84 por duplicado y una dilución en serie de los filtrados de cultivo con TE nativo expresado recombinantemente se utilizó para generar una curva patrón.

Cribado para toxicidad y antigenicidad

La toxicidad medida en filtrados de cultivo es un producto de toxicidad intrínseca (toxicidad por mol) y la concentración del mutante de TE. Lo mismo es cierto para la antigenicidad. Por lo tanto, una reducción de la toxicidad o antigenicidad, en comparación con la TE nativa, puede deberse a una concentración más baja, a una reducción de la toxicidad/antigenicidad intrínseca, o una combinación de las dos. Debido a que no se dispone un método para medir con precisión las concentraciones de TE (mutante) en filtrados de cultivo, los presentes inventores no pudieron medir directamente las toxicidades y antigenicidades intrínsecas de los mutantes de TE.

Para evitar dicho problema, los presentes inventores midieron la toxicidad y antigenicidad de los mutantes de TE respecto a la TE nativa. Ello nos permite describir los cambios de toxicidad y antigenicidad en filtrados de cultivo de mutante. A continuación, los presentes inventores dividieron el cambio de antigenicidad por el cambio de toxicidad para cada mutante.

En el caso de que se haya utilizado el mismo filtrado de cultivo para medir la toxicidad y la antigenicidad, ello nos permite eliminar los efectos de la concentración. Se definió esta medida como toxoidicidad:

$$\text{toxoidicidad} = \frac{A_r}{T_r} = \frac{A_i \times c}{T_i \times c} = \frac{A_i}{T_i}$$

- 5 en la que c es la concentración, A_r es la antigenicidad relativa del filtrado de cultivo, T_r es la toxicidad relativa del filtrado de cultivo, A_i es la antigenicidad intrínseca y T_i es la toxicidad intrínseca. Los buenos candidatos a toxoide presentarán una toxoidicidad elevada.

Purificación de mutantes de TE

- 10 Se transformaron células de *E. coli* BL21 con uno de los plásmidos pUC19-STh [Zhang et al., PMID: 19858307], pUC19-STh-N12T, pUC19-STh-A14Q, pUC19-STh-A14T y pUC19-STh-T16M, y se cultivaron durante 12 h en medio 4AA (6 l). Se purificaron TEh y mutantes de TEh a partir de sobrenadantes de cultivo en bruto que se prepararon mediante centrifugación seguido de ultrafiltración mediante un procedimiento modificado de Dreyfus et al. [PMID:6358024]. Brevemente, se aplicaron sobrenadantes de cultivo en bruto a una columna Amberlite XAD-2. La columna se lavó con agua destilada y se eluyó TE con metanol/ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés) (volúmenes de 99,9 y 0,1, respectivamente), seguido de 200 ml de metanol/agua/TFA (volúmenes de 80, 19,9 y 0,1, respectivamente). Se agruparon los eluidos y se redujo el volumen a 8-10 ml mediante evaporación y posteriormente se aplicaron a una columna de filtración en gel Bio-Gel P-6. La columna se eluyó con un tampón de TrisHCl 20 mM, NaCl 200 mM (pH 7,5) a 4°C a un caudal de 25 ml/h. Se agruparon las fracciones que contenían TE y se sometieron a HPLC de fase inversa C18 utilizando un gradiente de 30-85% de metanol. Se ajustó el pH de la muestra final a pH 7,2-7,4 y se almacenó a -20°C.

Conjugación química de TEh (mutantes) a albúmina de suero bovino

- 25 Las TEh (mutantes) se acoplaron químicamente con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) utilizando glutaraldehído tal como se ha descrito [Lockwood y Robertson; PMID:6520401].

Inmunización de ratones

- 30 Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con 200 ng de conjugados de TEh (mutante) en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (primario) y dos refuerzos a la misma dosis (pero con adyuvante incompleto de Freund) quincenalmente. Los ratones inmunizados con conjugados de TEh (mutante) desarrollaron anticuerpos anti-TEh, pero no los ratones de control.

- 35 Titulación de anticuerpos anti-TE

- Se titularon anticuerpos IgG anti-TE en suero de ratones inmunizados. Se añadieron 10 ng de conjugados de TE-ovalbúmina en 100 µl de tampón de ELISA de TEa (Zhang et al., 2010) a cada pocillo de una placa Costar (Corning Inc., Corning, NY) y se incubaron durante 1 h a 37°C, seguido de incubación a 4°C durante la noche. Tras lavar dos veces con PBST, se bloquearon con leche desnatada (en PBST) a 37°C durante 1 h; se lavaron las placas, se añadieron 100 µl de suero (1:25 diluido en leche al 1%-PBST) a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a 37°C. Tras el lavado, se añadieron 100 µl de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con HRP a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a 37°C, seguido de lavados e incubación con 100 µl de sustrato de peroxidasa TMB (KPL) durante 20 min. Se midió la densidad óptica (DO) y se calcularon los títulos de anticuerpo.

- 45 Ensayo de neutralización

- Se sometió a ensayo la neutralización de TEh por sueros de ratón anti-TEh mediante un kit de EIA de GMPc (Assay Design, Ann Arbor, MI) y con células T84. Las células T-84 se cultivaron tal como se ha indicado anteriormente. Se incubaron 2 ng de toxina TEh (diluidos en 150 µl de medio DMEM/F12) con 30 µl de antisueros (agrupados procedentes de ratones en el grupo de inmunización, diluidos en 120 µl de medio DMEM/F12, por triplicado) a temperatura ambiente. Tras 1 h de incubación, la mezcla (150 µl de dilución de toxina TEh y 150 µl de antisueros diluidos) se añadió a cada pocillo en el que se habían añadido células T-84 cultivadas en 700 µl de medio de cultivo, y la placa se incubó adicionalmente a 37°C en 5% de CO₂ durante 2 horas. Tras un lavado adicional, las células se lisaron con HCl 0,1 M (200 µl en cada pocillo) y después se neutralizaron con NaOH 0,1 M. Los lisados celulares se recolectaron mediante centrifugación a 660xg durante 10 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes resultantes se sometieron a ensayo para los niveles intracelulares de GMPc siguiendo el protocolo del fabricante.

- 60 Anticuerpos monoclonales (mAb) anti-TE

El mAb anti-TEh TE:G8 se obtuvo de S. Visweswariah [Garrett y Visweswariah; PMID: 8950201]. Se obtuvieron los mAb anti-TEp, clones 29, 30 y 31, de Fitzgerald Industries International.

ELISA competitivo de TEh utilizando anticuerpos monoclonales anti-TE

Las placas ELISA (Nunc Amino Immobilizer) se recubrieron con conjugado TEh-OvA en PBS; volumen: 100 µl en cada pocillo (TEh sintético conjugado con OvA: Para TE:G8, 0,04 µl/pocillo; para los clones 29 y 30: 0,01 µl/pocillo). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Después, se vaciaron las placas y se bloquearon con PBS-T OvA al 1% durante 1 h a 20°C bajo agitación a 180 rpm. Tras el lavado (3x con PBS-T) se añadió a los pocillos un volumen de 60 µl de muestra y 60 µl de dilución de anticuerpo primario. Las diluciones finales de mAb eran las siguientes: ST:G8 1:6500, clon 29 1:16000, clon 30 1: 30000. Se llevó a cabo la incubación competitiva durante 90 minutos a 180 rpm, a 20°C. A continuación, se lavaron las placas con 3x200 µl de PBS-T y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con anticuerpo secundario diluido en PBS-T; 100 µl en cada pocillo (dilución antirratón: 1:400 para el ELISA de TE:G8; dilución antirratón de 1:2000 para el ELISA de los clones 29 y 30). Tras un nuevo lavado con 3x200 µl de PBS-T, se revelaron las placas con 100 µl de tampón de revelado durante 15-20 minutos. Se detuvo el revelado mediante la adición de 50 µl de NaOH 2 M a cada pocillo y se leyó la DO a 405 nm con un lector de lacas Fluostar Optima.

Para el mAb del clon 31 se siguió un protocolo ligeramente diferente. Se recubrieron las placas de ELISA (Nunc CovaLink) con TEp sintético siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron a todos los pocillos 50 µl de PBS con TEp. Después, se preparó una solución de carbodiimida/EDC mediante la adición de 1,84 mg de BS3 a 5 mg de EDC en 10 ml de PBS y se añadieron 50 µl de dicha solución a todos los pocillos. La concentración final de TEp era de 0,5 µM en la solución de recubrimiento. Las placas se incubaron durante la noche a 20°C. A continuación, se llevó a cabo el ELISA con etapas de lavado, etapas de bloqueo y revelado, tal como se han indicado anteriormente. Antes de la etapa de incubación competitiva, las muestras y soluciones de anticuerpos se premezclaron en una placa de microtitulación no absorbente y después se transfirieron a la placa de recubrimiento con una pipeta multicanal, minimizando de esta manera el tiempo en que se dejaba secar la placa de recubrimiento. Concentración final del anticuerpo primario del clon 31: 1:16000; la del anticuerpo secundario era 1:500.

Resultados

La totalidad de las 361 variantes mutantes de TE se expresaron en un fondo de *E. coli* TOP10, y los filtrados de cultivo se analizaron para la toxicidad utilizando el ensayo en células T-84 de GC-C y para antigenicidad utilizando los ensayos de ELISA competitivo de TEh y TEp.

Los ensayos presentaban diferentes límites de detección: el límite de detección para el ELISA de TEp era ~50-60 veces el de filtrados de cultivo de TE de tipo salvaje diluidos; el límite del ELISA de TEh era de ~400, mientras que los filtrados de cultivo de TE de tipo salvaje pueden diluirse ~700-750 veces y todavía eran detectables en el ensayo de células T-84.

Para ayudar a la interpretación de los resultados, se muestra un modelo estructural de TEh en la fig. 1. El denominado dominio tóxico de TEh está comprendido entre los residuos 6 y 18 y es idéntico a los residuos 5 a 17 de TEp, excepto para TEh T16, que se sustituye por A15 en TEp. TEh y TEp también comparten las dos tirosinas que flanquean el dominio tóxico (TEh: Y05, Y19; TEp: Y04, Y18), aunque difieren en el extremo N-terminal (TEh: NSSN, TEp: NTF). Los residuos en TEh que se ha propuesto que interactúan con el receptor de la guanilina ciclasa C son N12, P13 y A14, que corresponden a los residuos de TEp N11, P12 y A13.

Identificación de los candidatos a toxoide TE

Las medianas de los efectos sobre la toxicidad de T84 y la antigenicidad de TEh para cada posición aminoácido de TEh se muestran en la fig. 2. Observar que la toxicidad de los mutantes que no presentaban ninguna toxicidad detectable se fijó en el límite de detección (0,0014) para garantizar evaluaciones conservadoras de los efectos sobre la toxicidad.

En las posiciones N-terminales N01, S02, S03, N04 y Y05, las medianas de los efectos sobre tanto toxicidad como antigenicidad eran pequeñas. En contraste, las posiciones de dominio tóxico (16-18) e Y19 mostraban efectos más drásticos sobre la toxicidad, la antigenicidad, o ambos.

Para las posiciones C06, E08, T16, G17 e Y19, las medianas de toxoidicidad eran negativas, estando comprendidas entre -2 (G17) y -10,5 (E08). Lo anterior sugiere que dichas posiciones (excepto G17) podrían formar uno o más epítopos reconocidos por el antisuero anti-TEh. Observar que los residuos E08 y T16 se encuentran en el lado opuesto de los denominados residuos de interacción con receptor, N12, P13 y A14 (fig. 1). La posición Y19 de hecho presenta el efecto más drástico sobre la antigenicidad (sólo tres presentaban antigenicidades detectables), con poco efecto sobre la toxicidad, sugiriendo que podría ser un determinante antigénico clave. En resumen, estos resultados indican que en efecto resulta posible separar toxicidad y antigenicidad.

Los residuos más interesantes de una perspectiva de vacuna son los que presentan toxoidicidades positivas. Éste es el caso de L08, C11, n12, P13 y A14, con medianas de toxoidicidad comprendidas entre 3 (C11) y 92 (A14). Sólo dos posiciones presentaban medianas de toxoidicidad superiores a diez: N12 (14) y A14 (92), y aparentemente, de promedio, son las posiciones más atractivas para ser dianas en una vacuna. Ambos son residuos que interactúan con receptores.

Las mutaciones en C07, C10, C15 y C18 presentan efectos no cuantificables profundos sobre toxicidad y antigenicidad, y por lo tanto no aparecen en los gráficos o tablas.

5 La fig. 3 muestra los resultados de toxicidad de T84 y de antigenicidad de TEh para la totalidad de los 219 mutantes individuales que presentaban antigenicidades de TEh detectables.

La Tabla 1 lista los candidatos a toxoide que presentaban toxoidicidades de cien o superiores, y lo mejores candidatos a toxoide para posiciones en las que la toxoidicidad máxima era superior a diez.

10 Antigenicidad de TEh respecto a la antigenicidad de TEp.

El cribado también se llevó a cabo con un ELISA de TEp y los resultados de una ocmpración con el cribado de ELISA de TEh se muestran en la fig. 4. En las posiciones S03, N12, P13 e Y19, la mediana de antigenicidad se había elevado 1,4 a 4,5 veces en el ELISA de TEh comparado con el ELISA de TEp.

20 Las posiciones N01, S02, N04, Y05, C06, E08, L09, A14 y G17 mostraron el efecto opuesto, con antigenicidades de TEp elevadas 1,1 a 7,7 veces. Se observó la diferencia más drástica con la posición T16, que mostró un incremento de 52 veces respecto a la antigenicidad de TEp. Lo anterior se debe muy probablemente al hecho de que TEh y TEp difieren en dicha posición. TEp presenta un residuo de alanina en lugar del residuo de treonina de TEh. De hecho, el mutante T16A muestra un incremento de 19 veces de la antigenicidad de TEp, sugiriendo que la posición 16 es una parte del epítipo reconocido por el anticuerpo anti-TEp. La drástica reducción media de antigenicidad en el ELISA de TEh sugiere que T16 también es parte de un epítipo de TEh.

25 Una tendencia general que puede observarse es que los mutantes aparentemente afectan a la antigenicidad de TEh más que a la antigenicidad de TEp. Esta observación, junto con la sensibilidad prácticamente 10 veces más elevada del ELISA de TEh, sugiere que el anticuerpo anti-TEh presenta una afinidad significativamente más elevada para TEh que el anticuerpo anti-TEp (observar que el antisuero anti-TEh se purificó con proteína A, al contrario que el suero anti-TEp. Ello también podría contribuir a la diferencia de sensibilidad). Una probable explicación de ello es esta diferencia en la posición 16 en TEh y TEp.

30 Otra tendencia general que puede observarse es que las mutaciones en el denominado dominio tóxico (residuos 6-19) presentan un efecto más drástico sobre la antigenicidad de tanto TEh como de TEp que las presentes en la cola N-terminal (1-5). Aunque no puede descartarse la probabilidad de que la diferencia observada se deba a diferencias en los niveles de expresión, podría sugerir que el extremo N-terminal no es parte de un epítipo reconocido por los dos sueros.

Los mutantes de TE inducen anticuerpos neutralizadores en los ratones.

40 Se han purificado con éxito cuatro mutantes de TEh y se han conjugado químicamente con glutaraldehído a albúmina de suero bovino (BSA): N12T, A14Q, A14T y T16M. A14Q es el segundo mejor candidato a toxoide según el cribado (Tabla 1) y A14T es el número cuatro. N12T es el número 11 en la lista de candidatos (Tabla 2) y es el tercer mejor candidato N12. T16M es un mal candidato a toxoide y se incluyó como control además del TEh nativo.

45 Se utilizó cada uno de los cinco constructos conjugados para inmunizar cinco ratones. Todos los constructos indujeron anticuerpos específicos de TEh nativos. Para someter a ensayo la actividad neutralizadora, los sueros resultantes del mismo conjugado se agruparon y se utilizaron en el ensayo de células T84. La totalidad de los cinco constructos sometidos a ensayo fue capaz de neutralizar 2 ng de TEh nativo (que se demuestra resulta suficiente para estimular GMPc en células T-84) en el ensayo.

50 Los anticuerpos anti-TEh reaccionan cruzadamente con la uroguanilina.

55 Con el fin de identificar potenciales epítipos compartidos entre TE y los péptidos endógenos guanilina y uroguanilina, se sometieron a ensayo los péptidos endógenos frente a anticuerpos policlonales y monoclonales generados contra TEh y TEp. Los anticuerpos anti-TEh tanto policlonales como monoclonales se unieron a uroguanilina (pero no a guanilina) además de a TEh y a TEp (figura 5). Lo anterior demuestra que la reactividad cruzada es un problema real para el desarrollo de vacunas de TE, y que debe incorporarse activamente en el diseño de la vacuna de TE. Resulta interesante que ninguno de los anticuerpos anti-TEp sometidos a ensayo (uno policlonal y tres monoclonales) mostró ninguna reactividad cruzada. Ello podría sugerir que las vacunas de TE deberían basarse en TEp en lugar de en TEh. Sin embargo, los datos epidemiológicos sugieren que las ECET productores de TEh resultan más importantes para la enfermedad que los ECET que producen únicamente TEp y/o TL [Steinsland et al.; PMID: 12447759], y es un argumento para basar una vacuna de TE en TEh y no en TEp.

65 El mapeado de epítipos de los mAb anti-TE sugiere la mutación TEh para evitar la reactividad cruzada.

Los presentes inventores utilizando la biblioteca de mutantes para mapear los epítipos de dos mAb neutralizadores:

mAb TE:G8 anti-TEh y el mAb anti-TEp clon 30. Mediante el análisis de los efectos individuales sobre la antigenicidad de todas las mutaciones en todos los residuos no cisteína para ambos mAb, los presentes inventores pudieron identificar dos epítomos diferentes (figura 6). Las mutaciones en L9, N12 y T16 reducen la unión a TE:G8, mientras que las mutaciones en P13, G17 e Y19 reducen el reconocimiento por el mAb anti-TEp. Los dos conjuntos de residuos

forman dos zonas estructuralmente definidas, lo que concuerda con que son parte de epítomos estructurales. Resulta interesante que A14 aparentemente no es parte de cualquiera de los epítomos, ya que ninguno de las 19 variantes mutantes de A14 mostró una afinidad significativamente reducida para los mAb. Lo anterior resulta prometedor, ya que las mutaciones de A14 muestran las reducciones más acusadas de toxicidad.

Al contrario que el mAb TE:G8, el mAb anti-TEp no reacciona cruzadamente con la uroguanilina. Lo anterior aporta una nueva dimensión al mapeado de epítomos. Lo anterior demuestra que en efecto resulta posible generar anticuerpos neutralizadores contra epítomos de TE que no reaccionan cruzadamente con los péptidos (uro)guanilina. Los cuatro anticuerpos basados en TEp tienen en común que neutralizan TE pero no reaccionan cruzadamente con la (uro)guanilina. En el dominio tóxico, que es la región de similitud con los péptido (uro)guanilina, la única diferencia entre TEh y TEp es la posición T16 de TEh, que es A en TEp (A15). Ninguno de los mutantes de T16 mostró ningún efecto claro sobre la unión del clon 30, lo que sugiere claramente que el residuo A15 homólogo de TEp no es parte del epítomo del clon 30. Por lo tanto, estos datos sugieren que las vacunas basadas en TEh deberían contener una mutación T16A para evitar la reactividad cruzada.

Conclusiones

Los resultados del cribado sugieren que las dos posiciones claramente más interesantes para la mutación en un intento de producir un toxoide TEh son N12 y A14. Estos presentan medianas de toxoidicidad de 14 y 92, respectivamente.

Inesperadamente, cuatro mutantes de N12 aparentemente presentan antigenicidades superiores al TEh nativo (N12V, N12H, N12T y N12I). Dos de estos mutantes presentan toxicidades reducidas respecto al TEh nativo: N12T (0,03) y N12 0,01) y son candidatos a toxoide.

Diecisiete de las diecinueve mutaciones en la posición A14 conducen a toxicidades no medibles (las dos excepciones son A14G y A14S). Los efectos sobre la antigenicidad relativa varían entre 0,02 y 0,7. El hecho de que los mejores candidatos a toxoide en la posición A14 presentan antigenicidades próximas a las del TEh nativo es muy prometedor.

Tres otras posiciones aparentemente alojan mutantes que son candidatos a toxoide moderadamente buenos: P13, L09 y E08 (Tabla 1). La mediana de las toxoidicidades de P13 y L09 (3 y 7,9, respectivamente) sugiere que dichas posiciones resultan moderadamente interesantes para generar toxoides TEh. La mediana de toxicidad de -10,5 de E08, por otra parte, sugiere que E08 es una mala posición para generar toxoides TE. Sin embargo, al evaluar los mutantes de E08 individuales, surgen dos candidatos interesantes: E08R y E08K. Resulta interesante que todos los mutantes de E08 afectan a la antigenicidad relativa en un grado similar, entre 0,008 y 0,08 (diez veces), mientras que las toxicidades relativas varían mucho más, estando comprendidas entre 0,0014 y 1,2 (por lo menos 857 veces). Los resultados obtenidos con los mutantes en la posición E08 demuestran la potencia del cribado de una biblioteca de todas las posibles mutaciones de aminoácidos individuales, y no, p.ej., un escaneo de mutaciones de alaninas.

Además, los datos de los presentes inventores sugieren que las vacunas basadas en TEh podrían contener una mutación T16A para evitar la reactividad cruzada.

Tabla 1

Mutante de TEh	Antigenicidad	Toxicidad	Toxoidicidad
A14H	0,6911	0,0014 ²	493,64
A14Q	0,5616	0,0014 ²	401,14
A14R	0,5564	0,0014 ²	397,43
A14T	0,4168	0,0014 ²	297,71
A14E	0,2700	0,0014 ²	192,86
N12K	0,1645	0,5113	121,71
A14I	0,1645	0,0014 ²	117,50
L09G	0,0403	0,0014 ²	28,79
P13A	0,0301	0,0014 ²	21,50
E08R	0,0244	0,0021	11,62
N04L	1,6125	0,2934	5,50
C11T	0,0075	0,0014 ²	5,36
C06P	0,0064	0,0014 ²	4,57
S03F	1,5714	0,3871	4,06
Y05D	0,9676	0,2703	3,58
T16R	0,0233	0,0111	2,10
G17Y	0,0329	0,0234	1,41

ES 2 743 431 T3

Mutante de TEh	Antigenicidad	Toxicidad	Toxoidicidad
S02N	0,9719	0,7308	1,33
N01M	1,2547	1,8910	0,66
Y19F	0,0904	0,4178	0,22

Tabla 2: mutantes de TEh ordenados según toxoidicidad

Mutante	Toxoidicidad
A14H	493,64
A14Q	401,14
A14R	397,43
A14T	297,71
A14E	192,86
N12K	121,71
A14I	117,50
A14L	92,71
A14K	91,71
N12V	89,72
N12T	80,00
A14W	79,43
A14N	64,43
A14M	60,50
N12E	58,38
A14D	56,64
N12R	56,57
A14F	51,29
A14V	49,00
N12S	44,32
N12G	39,36
A14Y	32,50
L09G	28,79
N12A	28,63
L09S	28,36
L09A	28,29
L09E	27,14
L09P	25,43
N12W	25,10
N12Q	25,09
L09D	24,86
N12M	23,59
P13A	21,50
L09R	17,17
N12D	16,21
P13F	13,04
A14C	12,64
E08R	11,62
P13E	10,21
N12Y	10,14
E08K	8,75
A14P	8,71
L09N	8,50
L09H	8,36
L09K	7,76
L09M	6,31
E08C	5,86
N12P	5,57
N04L	5,50
A14G	5,38
C11T	5,36
N12F	4,91
C11Q	4,59
C06P	4,57
P13H	4,25

Tabla 2 (continuación)

Mutante	Toxoidicidad
S03F	4,06
C11S	3,94
S02L	3,92
C11N	3,58
Y05D	3,58
P13G	3,26
P13S	3,25
Y05E	3,08
P13Y	2,95
L09V	2,81
P13W	2,33
N04K	2,18
N01C	2,14
C06V	2,14
C06Y	2,14
C07A	2,14
C07D	2,14
C07E	2,14
C07F	2,14
C07G	2,14
C07H	2,14
C07I	2,14
C07K	2,14
C07L	2,14
C07M	2,14
C07N	2,14
C07P	2,14
C07Q	2,14
C07R	2,14
C07S	2,14
C07T	2,14
C07V	2,14
C07W	2,14
C07Y	2,14
L09C	2,14
C10A	2,14
C10D	2,14
C10E	2,14
C10F	2,14
C10G	2,14
C10H	2,14
C10I	2,14
C10K	2,14
C10L	2,14
C10M	2,14
C10N	2,14
C10P	2,14
C10Q	2,14
C10R	2,14
C10S	2,14
C10T	2,14
C10V	2,14
C10W	2,14
C10Y	2,14
C11K	2,14
C11R	2,14
N12C	2,14
N12L	2,14
C15A	2,14
C15D	2,14

Tabla 2 (continuación)

Mutante	Toxoidicidad
C15E	2,14
C15F	2,14
C15G	2,14
C15H	2,14
C15I	2,14
C15K	2,14
C15L	2,14
C15M	2,14
C15N	2,14
C15P	2,14
C15Q	2,14
C15R	2,14
C15S	2,14
C15T	2,14
C15V	2,14
C15W	2,14
C15Y	2,14
C18A	2,14
C18D	2,14
C18E	2,14
C18F	2,14
C18G	2,14
C18H	2,14
C18I	2,14
C18K	2,14
C18L	2,14
C18M	2,14
C18N	2,14
C18P	2,14
C18Q	2,14
C18R	2,14
C18S	2,14
C18T	2,14
C18V	2,14
C18W	2,14
S03V	2,14
T16R	2,10
N12I	2,00
S03D	1,99
A14S	1,90
C11V	1,85
C06E	1,78
C11I	1,74
S03E	1,73
S03R	1,72
E08W	1,69
N12H	1,64
C11M	1,59
C11P	1,56
S03T	1,52
N04M	1,45
S03L	1,43
G17Y	1,41
G17M	1,39
Y05M	1,35
S02N	1,33
C11L	1,30
P13C	1,30
L09I	1,29
S03H	1,27

Tabla 2 (continuación)

Mutante	Toxoidicidad
S03Q	1,27
T16P	1,24
L09T	1,20
C11Y	1,20
S02M	1,17
G17W	1,11
C06R	1,11
Y05A	1,10
P13T	1,04
S02H	1,03
P13N	1,03
S03A	1,01
S02G	1,00
S03G	0,97
N04I	0,92
G17H	0,92
P13K	0,92
N04F	0,91
P13L	0,90
S03P	0,87
Y05N	0,85
S03M	0,83
T16Q	0,81
T16V	0,81
E08F	0,79
S03Y	0,78
Y05C	0,77
N04A	0,73
C11W	0,73
S03I	0,72
N04V	0,72
S02F	0,71
P13I	0,69
Y05L	0,69
S02R	0,68
N04T	0,67
N01M	0,66
N01S	0,66
T16A	0,65
P13R	0,64
L09Q	0,60
Y05F	0,59
C06W	0,59
S03W	0,57
S03N	0,56
N01L	0,55
C06S	0,54
C06Q	0,54
T16L	0,50
P13D	0,49
S02A	0,47
N04S	0,47
Y05P	0,47
C06D	0,46
L09F	0,43
S02I	0,42
S03C	0,42
T16K	0,41
N04W	0,41
Y05S	0,41

Tabla 2 (continuación)

Mutante	Toxoidicidad
Y05I	0,39
C06T	0,37
N04P	0,37
N04D	0,35
N04E	0,35
G17N	0,34
Y05G	0,34
G17D	0,34
G17S	0,33
Y05H	0,33
T16N	0,30
E08G	0,30
N04G	0,29
S03K	0,29
N01T	0,28
P13V	0,28
P13M	0,27
T16C	0,27
N04Q	0,27
E08D	0,26
L09W	0,25
T16H	0,24
S02V	0,23
Y05T	0,23
T16S	0,23
T16I	0,23
N04C	0,23
T16M	0,22
Y19F	0,22
E08Y	0,21
N01I	0,21
S02T	0,21
S02K	0,18
N04R	0,18
S02Q	0,18
N01V	0,17
Y05R	0,16
C06N	0,16
T16D	0,15
L09Y	0,14
Y19C	0,14
C06K	0,14
T16G	0,14
S02P	0,14
N01F	0,13
E08A	0,13
P13Q	0,13
S02Y	0,13
Y19H	0,12
Y05V	0,12
Y05Q	0,12
S02E	0,11
S02D	0,11
T16F	0,11
Y19S	0,11
E08H	0,10
G17V	0,10
G17F	0,10
T16Y	0,10
E08N	0,10

Tabla 2 (continuación)

Mutante	Toxoidicidad
N01E	0,09
G17K	0,09
G17R	0,09
E08Q	0,09
G17I	0,09
C06H	0,08
G17C	0,08
G17P	0,08
C06A	0,08
T16W	0,07
C06I	0,07
G17T	0,07
G17L	0,07
E08L	0,06
S02C	0,05
Y19D	0,05
G17E	0,05
E08M	0,04
C06L	0,04
N01W	0,04
C06M	0,04
T16E	0,04
C06F	0,04
Y19K	0,04
Y19P	0,04
Y05K	0,04
Y19E	0,04
E08P	0,04
Y05W	0,03
E08S	0,03
E08V	0,03
N01Y	0,03
N01K	0,03
N01D	0,03
Y19T	0,03
N01G	0,02
G17Q	0,02
N01H	0,02
E08I	0,02
Y19R	0,02
C06G	0,02
G17A	0,02
N01A	0,01
N04Y	0,01
S02W	0,01
C18Y	0,01
N01P	0,01
Y19G	0,01
Y19I	0,01
Y19N	0,01
N01Q	0,01
Y19V	0,01
E08T	0,01
Y19Q	0,01
Y19L	0,01
Y19M	0,01
Y19W	0,01
Y19A	0,00
N01R	0,00
N04H	0,00

REIVINDICACIONES

- 5 1. Mutante de una toxina termoestable (TE) de *E. coli* que presenta la secuencia siguiente:
NSSNYCCELCCNPTCTGCT, o
NSSNYCCESCCNPTCTGCT, o
NSSNYCCEACCNPTCTGCT.
- 10 2. Mutante de una toxina termoestable (TE) de *E. coli* que presenta la secuencia siguiente:
NTFYCCELCCNPTCAGCT, o
NTFYCCESCCNPTCAGCT, o
NTFYCCEACCNPTCAGCT.
- 15 3. Mutante según la reivindicación 1 o 2, en el que el mutante está acoplado con un portador.
4. Ácido nucleico aislado que codifica un mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 5. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 4.
6. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 5.
- 25 7. Composición de vacuna que comprende el mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un ácido nucleico según la reivindicación 4 o un vector según la reivindicación 5, para la utilización en el tratamiento o la prevención de la infección por *E. coli*.
- 30

Figura 1: modelo estructural de TEh

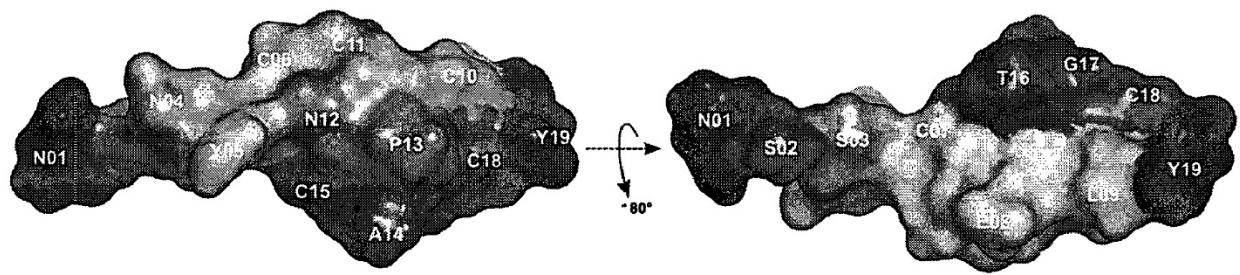


Figura 2: toxicidad de T85 comparada con la antigenicidad de TEh

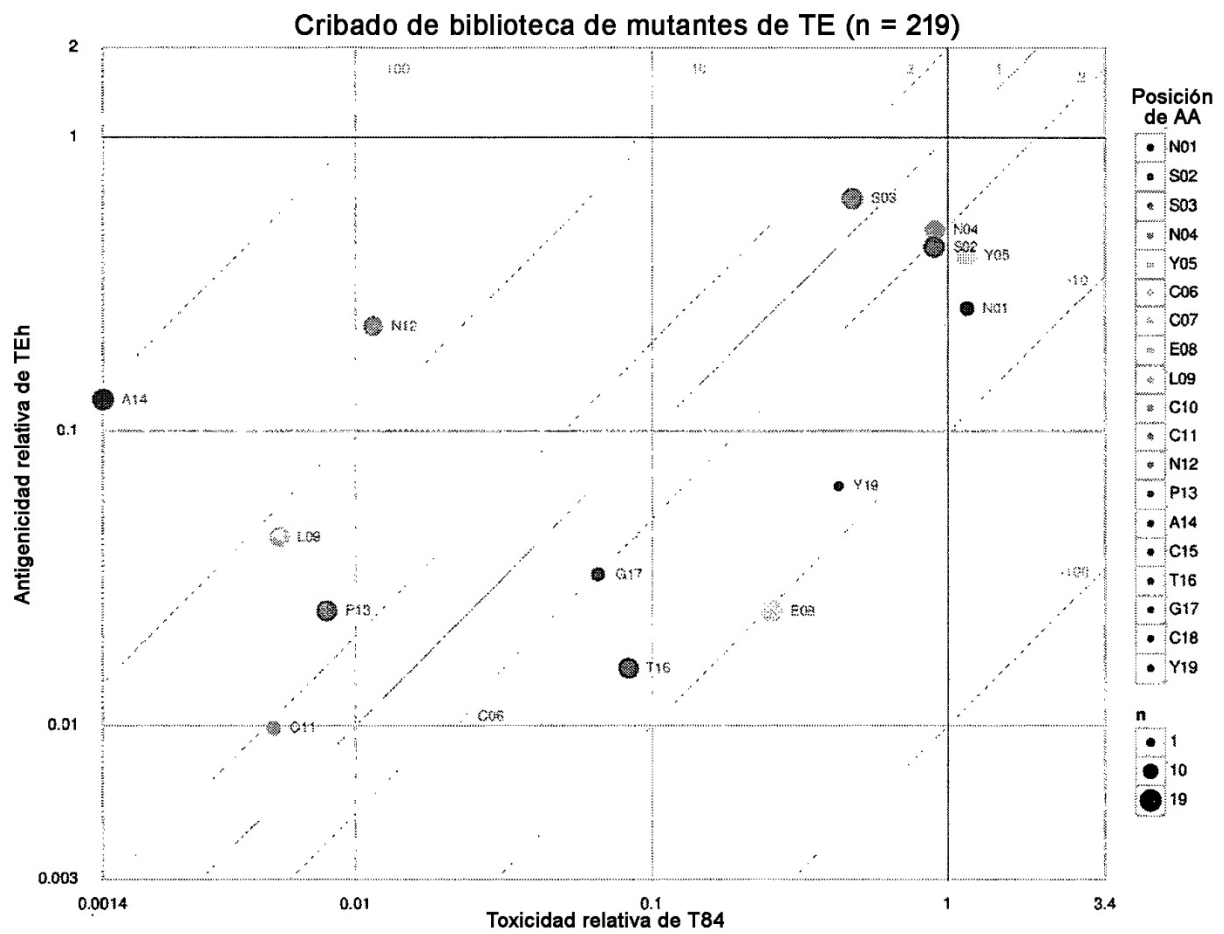


Figura 3. Toxicidad de T85 comparada con la antigenicidad de TEh

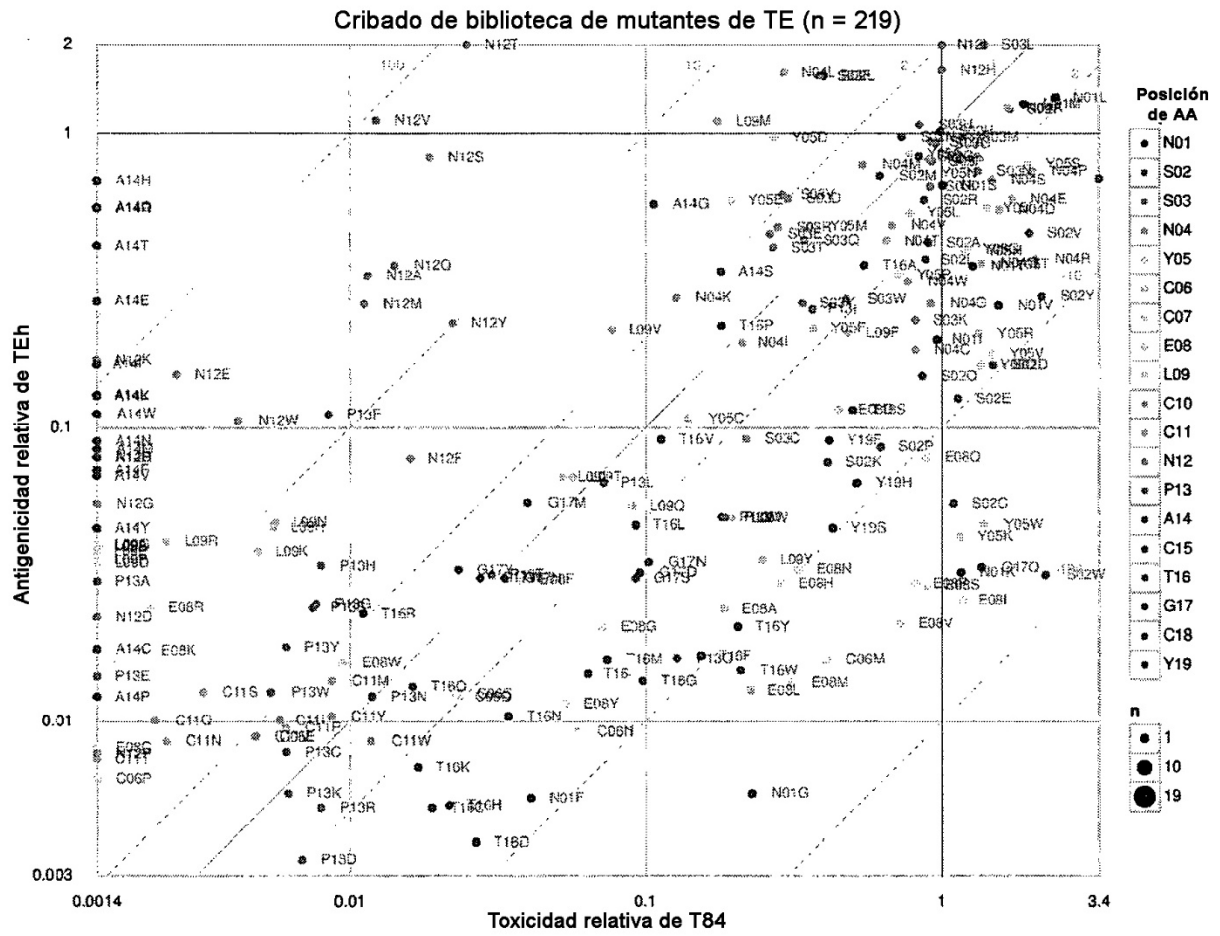


Figura 4. Antigenicidad de TEp comparada con la antigenicidad de TEh

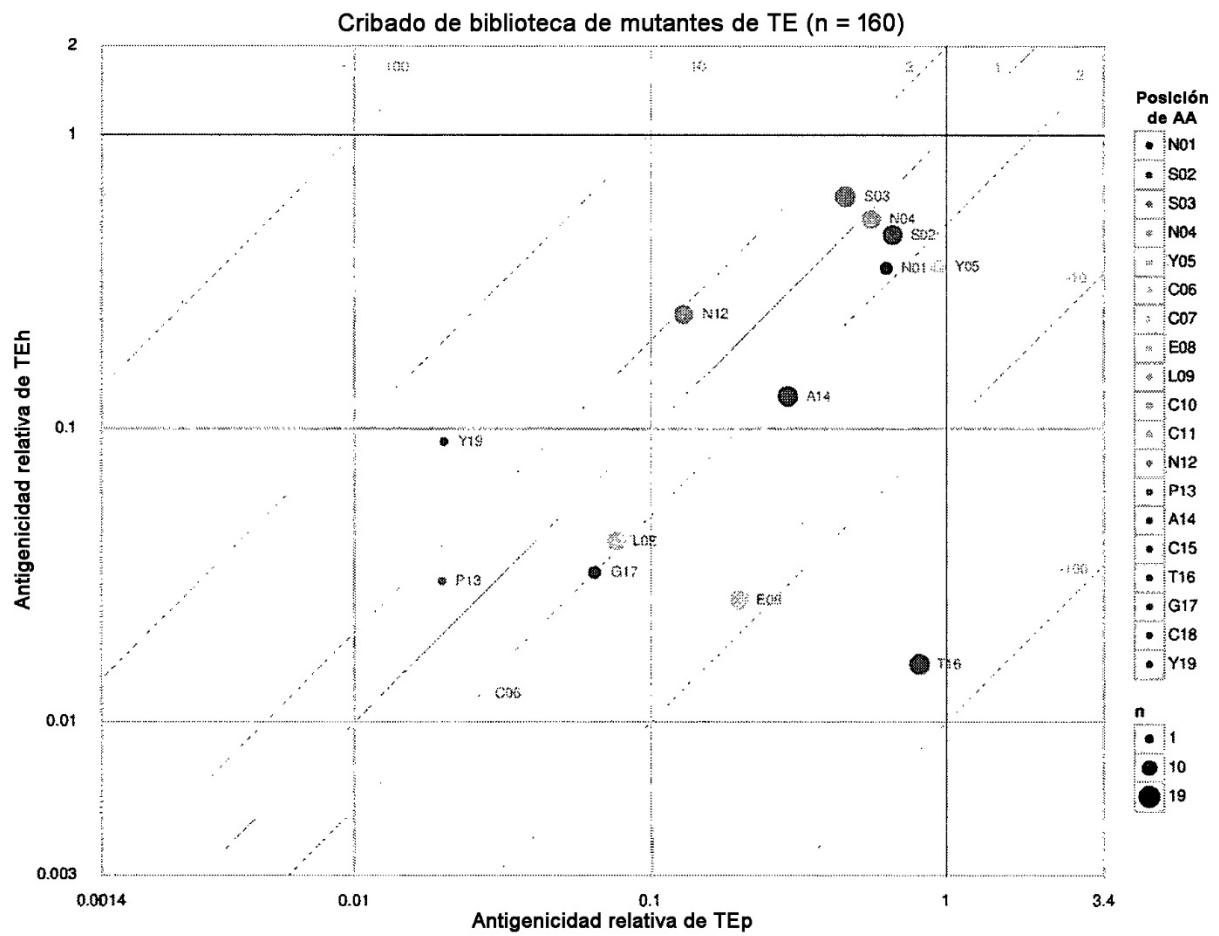


Figura 5

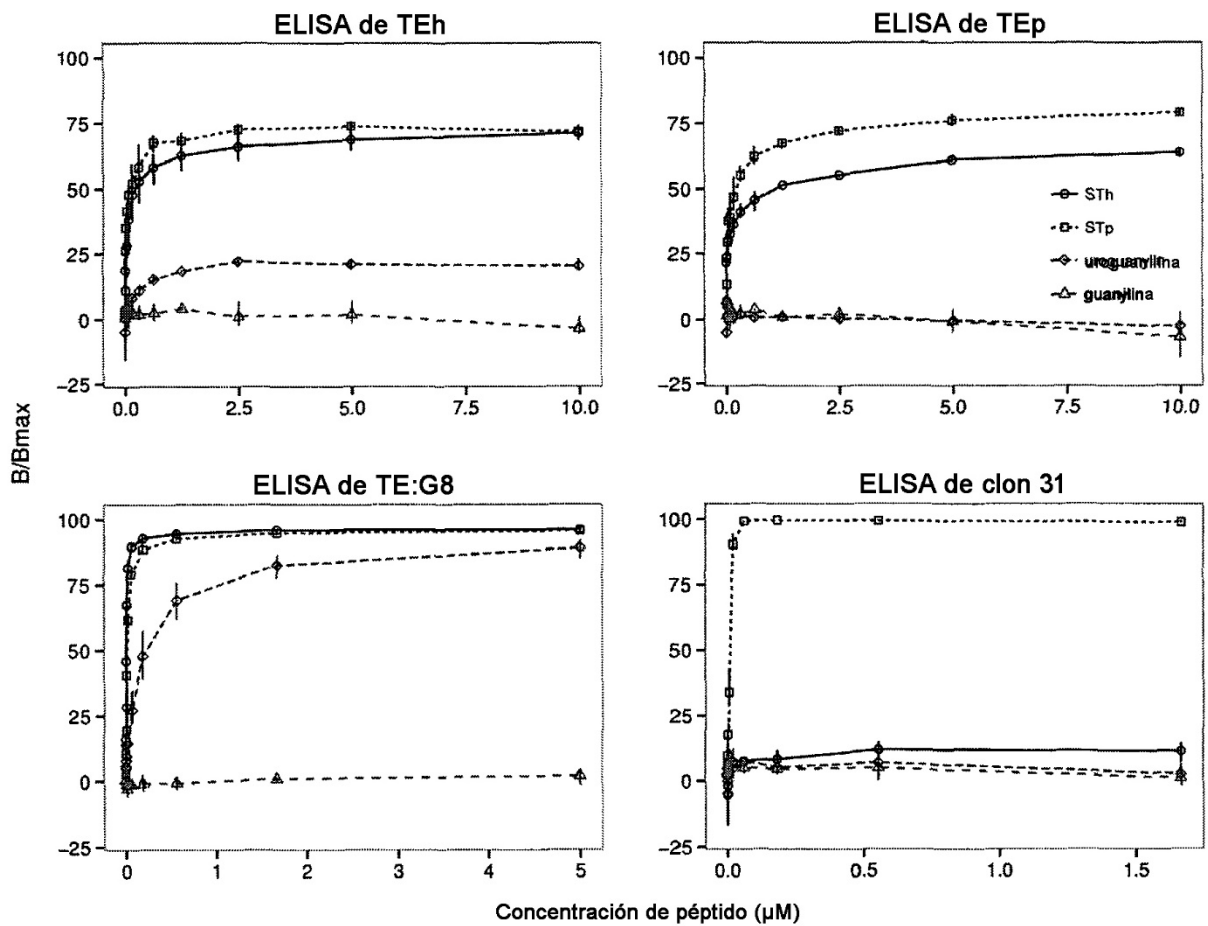


Figura 6

