



Industria y Comercio
UNIVERSIDAD DE COLOMBIA

02 5738

Radicación : 02005738 00000000
Fecha (AÑO): 2002-01-25 17:17:14
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 32

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3

①

SOLICITUD DE :



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: THE ADMINISTRATORS OF
THE TULANE EDUCATIONAL FUND

Dirección: 1430 Tulane Avenue

Teléfono:

Fax:

E-mail:

Domicilio: New Orleans, Estado de
Louisiana, Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección: Carrera 13 No.37-43, P.12

Teléfono: 2857460

Fax: 2859267

E-mail: infograu@colomsat.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número 17017671 TP 2978

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: John D. Clements

Dirección:

Teléfono:

Fax:

E-mail:

Domicilio New Orleans, Louisiana,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número _____

⑤

Título (54) MUTANTE GENETICAMENTE DISTINTO DE LA C.E. COLI

⑥

Clasificación Internacional (51) A61K 39/39 ; C07K 14/00.

⑦

Prioridad

SI ☐

NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

⑧

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☐

12 meses ☐

18 meses ☐

Otro ☐

⑨

Comprobante de pago No. 6.186/02

Fecha 1-25/02

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

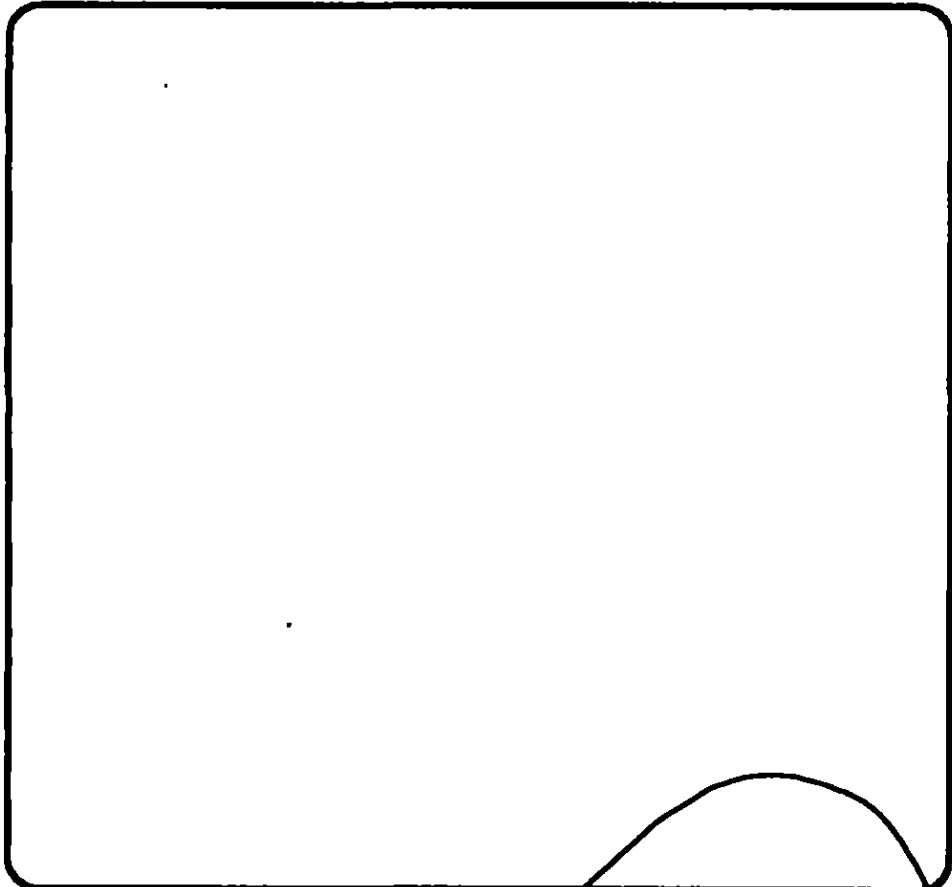
ANEXOS

10

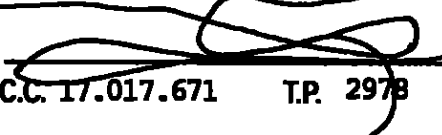
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Protocolo N° 18.293
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Descripción de la invención.
- ☒ Una o más reivindicaciones.
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Ane final 12x12.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAUFIRMA: 

C.C. 17.017.671

T.P. 2978

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.



3

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 6,186
FECHA : ENERO 25 DE 2002

Radicación : 02005738 00000000
Fecha (HH): 2002-01-25 17:17:14
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CASTILLO Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8995863	25/01/2002	756,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50905-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	\$ 378,000.00

MON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

AD

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El informe de la Organización Mundial de la Salud de muertes por enfermedades infecciosas en 1995 señala que durante ese año se presentaron más de 13 millones de muertes en todo el año. La mayoría de estas muertes fueron causadas por organismos que primero hacen contacto y luego se colonizan o cruzan las superficies mucosas para infectar las células anfitrionas. La morbilidad general causada por estos organismos y otros patógenos que interactúan con las superficies mucosas es imposible de calcular.

Las estrategias tradicionales de vacunación que implican la inmunización parenteral con virus o bacterias inactivos o subunidades de determinantes de virulencia relevante de esos patógenos no previene estas interacciones. De hecho, las estrategias tradicionales de vacunación no previenen la infección sino que por el contrario, resuelven la infección antes de que sobrevenga la enfermedad. En algunos casos, por el ejemplo VIH, una vez el virus traspasa la superficie mucosa e ingresa a la célula anfitriona, ya sea una célula



dentrítica, una célula epitelial, o una célula T, la relación célula anfitriona-parásita se mueve definitivamente en favor del parásito (VIH). En ese caso, como en muchos otros, es probable que no tenga éxito una estrategia de vacunación que no prevenga la infección inicial de la célula anfitriona.

Recientemente, se ha concentrado gran parte de la atención en la inmunización mucosa como medio para inducir anticuerpos secretores IgA (sIgA) dirigidos contra patógenos específicos de las superficies mucosas. El razonamiento de ello es el reconocimiento de que sIgA constituya más del 80% de todos los anticuerpos producidos en los tejidos linfoides asociados con mucosas en los seres humanos, y de que sIgA puede bloquear el establecimiento de bacterias y virus, neutralizar toxinas bacterianas, y aún, inactivar virus invasores dentro de las células epiteliales. Además, la existencia de un Sistema Común Inmune Mucoso permite la inmunización en una superficie mucosa para inducir la secreción del sIgA específico del antígeno en sitios de mucosa distantes. Solo hasta ahora se observa que la inmunización mucosa puede ser un medio efectivo para inducir no solo los anticuerpos sIgA, sino también un anticuerpos sistémicos e inmunidad mediada con células.

La respuesta inmune mucosa puede dividirse en dos fases (McGhee y Kiyono, 1993, *Infect Agents Dis* 12: 55-73). Primero, la fase inductiva implica la presentación del antígeno y los eventos de iniciación que dictan la respuesta inmune siguiente. Durante los eventos de iniciación, los linfocitos específicos de antígenos son cebados y migran desde los lugares de inducción (por ej: parches Peyer en la mucosa entérica) a través de los nodos linfáticos regionales, dentro de la circulación y de regreso a los sitios efectores de mucosa (por ej: *lamina propria*). Una vez estas células



efectoras han sembrado sus sitios efectores, se puede presentar la segunda fase, o la fase efectora de la respuesta inmune mucosa. Una diferencia significativa entre la inmunización mucosa y la inmunización parenteral es que mediante la inmunización mucosa se puede inducir inmunidad tanto mucosa como sistémica, mientras que la inmunización parenteral solo resulta en respuestas sistémicas.

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha tienen que ver con el componente secretor de anticuerpos de la respuesta mucosa y con los aspectos reguladores complejos involucrados con la inducción de anticuerpos sIgA luego de la inmunización mucosa y no con la respuesta de anticuerpos sistémico ni con la inmunidad celular inducida por inmunización mucosa. A este respecto, es importante entender el tipo de respuesta del linfocito T auxiliar inducido por la inmunización mucosa puesto que el tipo de linfocito T auxiliar estimulado por un antígeno es uno de los factores más importantes para definir qué tipo de respuesta inmune será la siguiente. Mosmann y colegas (Cherwinski y colaboradores, 1987, *Journal of Experimental Medicine* 166: 1229:1244; Mosmann y Coffman, 1989, *Annual Reviews of Immunology* 7: 145-173) descubrieron que existen al menos dos tipos de linfocitos T auxiliares (Th) que pueden identificarse con base en la secreción de citoquina. Los linfocitos Th1 secretan bastantes cantidades de IL-2 e INF-gamma y realizan respuestas inmunes mediadas con células (por ej: hipersensibilidad del tipo retardada y activación de macrófagos), mientras que los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y ayudan en la producción de anticuerpos para la inmunidad humoral. Entonces, en teoría, la estimulación antigénica de una subunidad de célula T auxiliar y no la otra, resultaría en la producción de un conjunto en



7

particular de citoquinas que definirían la respuesta inmune resultante.

La presencia de IL-2 e INF-gama agregada con un estímulo antigénico presentado por macrófagos en el contexto de moléculas MHC Clase II, pueden iniciar las respuestas tipo Th1. La capacidad que las células Th1 tiene de secretar IL-2 e INF-gamma amplifica aún más la respuesta activando las células Th1 de manera autócrina y los macrófagos de manera parácrina. Estos leucocitos activados pueden liberar citoquinas adicionales (por ej: IL-6) las cuales pueden inducir la proliferación y la diferenciación de linfocitos B específicos de antígenos para secretar anticuerpos (la fase efectora). En este escenario, frecuentemente, el isotipo predominante secretado por linfocitos B murinos es IgG2a. En un segundo escenario (Urban y colaboradores, 1992, *Immunol Rev* 127: 205-220), antígenos tales como alérgenos o parásitos, pueden estimular de manera efectiva una respuesta de linfocitos Th2 (la fase inductiva). La presentación de estos antígenos a las células Th2 puede resultar en la producción de linfoquinas IL-4 e IL-5, las cuales pueden inducir linfocitos B específicos de antígenos para secretar anticuerpos IgE e IgG1 o inducir *eosinophililia*, respectivamente (la fase efectora). Además, las células Th2 estimuladas pueden secretar IL-10 el cual tiene la capacidad de inhibir de manera específica la secreción de IL-2 y gamma INF mediante los linfocitos Th1 y también, inhibir la función del macrófago.

Si bien estas representaciones son simplistas, es obvio que el tipo de célula T auxiliar estimulada afecta la respuesta inmune celular que resulta, así como el isotipo de inmunoglobulina predominante secretado. Específicamnte, IL-4 estimula el paso a los isotipos IgE e IgG1, mientras que INF-

gamma estimula la secreción de IgG2. Varios estudios, la mayoría realizados *in vitro*, sugieren que IL-5, IL-6 y TGF-beta (Th3) pueden causar el paso del isotipo al IgA.

2.1 ADYUVANTES DE MUCOSA

Frecuentemente, los antígenos administrados por vía mucosa no son inmunogénicos. Se ha desarrollado una serie de estrategias a fin de facilitar la inmunización por vía mucosa, incluido el uso de mutantes de bacteria atenuados (por ej: *Salmonella spp.*) como vehículos de antígenos heterólogos, encapsulamiento de antígenos en microesferas, cápsulas de gelatina, diferentes formulaciones de liposomas, adsorción en nanopartículas, uso de complejos estimulantes inmunes lipofílicos, y la adición de productos bacterianos con propiedades adyuvantes conocidas. Los dos productos bacterianos con mayor potencial para funcionar como adyuvantes mucosos son la toxina de cólera (CT), producida por varias cepas de *Vibrio cholerae*; y la enterotoxina lábil térmica (LT) producida por algunas cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* (Clements y colaboradores, 1998, *Vaccine* 6:269-277; Elson, 1989, *Immunology Today* 22:2277-2281; Xu-Amano y colaboradores, 1993, *Journal of Experimental Medicine* 178: 1309-1320; Yamamoto y colaboradores, 1996, *Annals of the New York Academy of Sciences* 778:64-71).

Aunque LT y CT tiene muchas características comunes, estas son moléculas claramente distintas con diferencias bioquímicas e inmunológicas que las hacen únicas (ver abajo). Tanto LT como CT son sintetizadas como toxinas de múltiples subunidades con componentes A y B. Cuando se reduce el tiol, el componente A se disocia en dos cadenas más pequeñas de polipéptidos. Una de estas cadenas, la pieza A1, cataliza la ribolización ADP de la proteína estimuladora ligante de

9

GTP (Gsa) en el complejo de la enzima de adenilato ciclasa en la superficie basolateral de la célula epitelial resultando en un aumento de niveles intracelulares de cAMP. El resultante aumento en cAMP causa la secreción de agua y electrolitos en el intestino delgado a través de la interacción con dos mecanismos de transporte de iones sensibles a cAMP que implican: 1) co-transporte de NaCl a través del borde de cepillo de las células epiteliales vellosas, y 2) secreción electrogénica de Cl dependiente de Na por las células encriptadas (Field, 1980, *Secretory Diarrhea* pags 21-30). La subunidad B se liga al receptor de la membrana de la célula anfitriona (gangliósido GM1) y facilita la translocación de la subunidad A a través de la membrana de la célula.

Estudios recientes han examinado el potencial de CT y de LT como adyuvante mucoso contra una variedad de patógenos bacterianos y virales utilizando organismos totalmente muertos o subunidades purificadas de determinantes de virulencia relevantes de estos organismos. Algunos ejemplos representativos incluyen tétano toxoide (Xu-Amano y colaboradores, 1993, *Journal of Experimental Medicine* 178: 1309-1320; Yamamoto y colaboradores, 1996, *Annals of the New York Academy of Sciences* 778: 64-71; Xu-Amano y colaboradores, 1994 *Vaccine* 12: 903-911, virus de influenza inactivado (Hashigucci y colaboradores, 1996, *Vaccine* 14:113-119; Katz y colaboradores, 1996, *Options for the control of influenza. III.*, pags- 292-297; Katz y colaboradores, 1987, *Journal of Infectious Diseases* 175: 352-363), ureasa recombinante de *Helicobacter spp.* (Lee y colaboradores, 1995, *Journal of Infectious Diseases* 172:161-171; Weltzin y colaboradores, 1997, *Vaccine* 4: 370-376), proteína superficial neumococal A de *Streptococcus pneumoniae* (Wu y

9

colaboradores, 1997, *Journal of Infectious Diseases* 175: 839-846), proteína cápsida del virus Norwalk, péptidos sintéticos del virus del sarampión (Hathaway y colaboradores, 1995 *Vaccine* 13: 1495-1500) y el péptido C4/V3 de VIH-1 T1SP10 MN(A) (Staats y colaboradores, 1996, *Journal of Immunology* 157: 462-472). Existen muchos otros ejemplos y es claro que tanto LT como CT tienen un potencial importante para ser utilizados como adyuvantes para antígenos administrados por vía mucosa (ver Dickinson y Clements, 1996, *Mucosal Vaccines* pags 73-87 de un análisis reciente). Con ello surge la posibilidad de un programa de vacunación efectivo contra una variedad de patógenos que implica la administración mucosa de agentes muertos o atenuados o de determinantes de virulencia relevantes de agentes específicos junto con LT o CT. Sin embargo, el hecho de que estas "toxinas" puedan estimular una respuesta luminal secretora neta, ello puede prevenir su uso. Por ejemplo, una cantidad tan pequeña como 5 µg de CT purificado fue suficiente para inducir bastante diarrea en voluntarios, mientras que se demostró que 25 µg provocaban una purga completa de cólera de 20 litros (Levine y colaboradores, 1983 *Microbiological Reviews* 47:510-550). En estudios con voluntarios realizados recientemente donde LT se administraba solo o junto con la vacuna de subunidad de la célula B V. *cholerae*, se demostró que LT inducía la secreción de fluido en dosis tan bajas como de 2.5 µg cuando se administraba junto con la vacuna, mientras que 25 µ de LT provocaban hasta 6 litros de fluido. Si bien la dosis efectiva del adyuvante en los seres humanos para cualquiera de estas toxinas aún no ha sido establecida, los experimentos en animales sugieren que la dosis puede ser comparable con la dosis tóxica. Tomados en conjunto, estos

AD

estudios señalan que mientras que LT y CT pueden ser atractivos como adyuvantes mucosos, los estudios en animales no reflejan el completo potencial tóxico de estas moléculas en seres humanos, y que la toxicidad limitará seriamente su uso práctico en seres humanos.

Se ha hecho una serie de intentos para alterar la toxicidad de LT y de CT, la mayoría de los cuales se han concentrado en eliminar la actividad enzimática de la subunidad A asociada con enterotoxigenicidad. La mayoría de estos esfuerzos implican el uso de mutagénesis dirigida en el sitio para cambiar los amino ácidos asociados con la grieta donde se cree que ocurre el enlace NAD y la catálisis. Recientemente se propuso un modelo para enlace NAD y catálisis (Domenighini y colaboradores, 1994, *Molecular Microbiology* 14:41-50; Pizza y colaboradores, 1994, *Molecular Microbiology* 14:51-60) con base en el análisis por computadora de la estructura cristalográfica de LT (Sixma y colaboradores, 1991, *Nature* (Londres) 351:371-377; Sixma y colaboradores, 1993, *Journal of Molecular Biology* 230: 890-918). El remplazo de cualquier amino ácido en CT o en LT implicado en un enlace NAD y catálisis a través de la mutagénesis dirigida en el sitio, ha demostrado que altera la actividad de la ribosiltransferasa ADP con la correspondiente pérdida de toxicidad en una variedad de sistemas de ensayo biológico (Lycke y colaboradores, 1992 *European Journal of Immunology* 22: 2277-2281; Burnett y colaboradores, 1991, *Infection and Immunity* 59:4266-4270; Harford y colaboradores, 1989, *European Journal of Biochemistry* 183: 311-316; Häse y colaboradores, 1994, *Infection and Immunity* 62: 3051-3057; Lobet y colaboradores, 1991, *Infection and Immunity* 59: 2870-2879; Merritt y colaboradores, 1995, *Nature Structural Biology* 2: 269-272; Moss y colaboradores, 1993, *Journal of*

Biological Chemistry 268: 6383-6387; Tsuji y colaboradores, 1991, *FEBS Letters* 291: 319-321; Tsuji y colaboradores, 1980, *Journal of Biological Chemistry* 265: 22520-22525). Además, se ha demostrado que el intercambio de K por E112 en LT no solo retira la actividad enzimática de la ribosilación de DP, sino también la activación cAMP y la actividad del adyuvante (Lycke y colaboradores, 1992 *European Journal of Immunology* 22: 2277-2281). Una conclusión lógica de los estudios de Lycke y colaboradores fue que la ribolisación ADP y la inducción de cAMP son esenciales para la actividad adyuvante de estas moléculas. Como resultado, se estableció un enlace causal entre la adyuvantividad y la enterotoxigenidad. Es decir, se consideró que la acumulación de cAMP responsable por la secreción neta de iones y fluidos en el lumen del intestino era un requisito para la adyuvantividad. Estudios recientes pro parte de una serie de laboratorios han desafiado ese enlace.

Dickinson y Clements (Dickinson y Clements, 1995 *Infection and Immunity* 63: 1617-1623) (Clements y colaboradores) exploraron un enfoque alterno frente a la disociación de enterotoxigenidad de adyuvantividad. Para que sea totalmente activo, LT requiere la proteólisis de un enlace sensible a la tripsina. En esta enterotoxina, ese péptido sensible a la tripsina es subtendido por un intercambio de disulfuro que une las piezas A1 y A2 de la subunidad-A. En teoría, si las piezas A1 y A2 no se pueden separar, A1 no podrá encontrar su objetivo (adenilato ciclase) en la superficie basolateral, ni asumir la conformación necesaria para enlazar o hidrolizar NAD. El mutante de Clements y colaboradores se describe en mayor detalle en la publicación PCT WO96/06627, incorporada en este contexto por referencia. La holotoxina mutante LT, designada

como LT(R192G), fue construida utilizando mutagénesis dirigida en el sitio para crear una sola sustitución de amino ácidos dentro de la región subtendida de disulfuro de la subunidad A, separando A1 de A2. Este cambio de amino ácidos alteró el sitio proteolíticamente sensible dentro de esta región, haciendo al mutante insensible a la activación de tripsina. Las características físicas de este mutante fueron examinadas por SDS-PAGE, su actividad biológica fue examinada en células tumorales adrenales Y-1 de ratones, y en las células Caco-2, sus propiedades enzimáticas se determinaron en un NAD *in vitro*: estudio de ADP-ribosiltransferasa agmatina, y sus capacidades de inmunogenicidad y de inmunomodulación se determinaron mediante prueba para la retención de inmunogenicidad y adyuvancia.

PROPIEDADES DE LT(R192G)

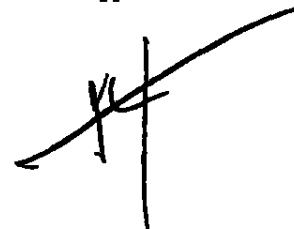
- 100 - 1,000 pliegues menos activo que la toxina de cólera o que LT nativa en el estudio de células adrenales Y-1 de ratones.
- No es sensible a la activación proteolítica.
- No posee un NDA *in vitro*: actividad ADP-ribosiltransferasa agmatina.
- No aumenta la producción de cAMP en células Caco-2 cultivadas.
- Reduce la enterotoxigenidad en el modelo de desafío intestinal en ratones de la patente en comparación con LT nativa.
- Fomenta el desarrollo tanto de respuestas humerales como de respuestas inmunes mediadas por células contra los antígenos co-administrados de un microorganismo patogénico tanto en el compartimento sistémico como mucoso.

14

- Funciona como un adyuvante efectivo cuando es administrado por vía mucosa (es decir, por vía oral, intranasal) o parenteral (es decir, por vía subcutánea).
- Le falta enterotoxigenicidad en seres humanos en dosis efectivas de adyuvantes.

Se ha demostrado que LT (R192G) posee la capacidad de realzar una respuesta inmune (por ej: IgG, IgA) frente a antígenos no relacionados con LT o LT (R192G). La reciente evidencia experimental demuestra que LT(R192G) es útil como adyuvante para antígenos administrados por vía mucosa o parenteral; esta administración resulta en la producción de suero IgG y o de SigA mucosa, así como respuestas inmunes mediadas por células contra el antígeno con el cual se entrega LT(R192G), y más importante, para protección contra el desafío subsiguiente con organismos infecciosos. Se ha demostrado que LT(R192g) es un adyuvante mucoso efectivo y recientemente ha sido evaluado en seres humanos en varios estudios de seguridad de Fase I.

Más recientemente, Tsuji y colaboradores (Tsuji y colaboradores, 1997 *Immunology* 90: 176-182) demostraron que a un mutante de eliminación LT(Δ 192-194) también le falta actividad ADP-ribosilamagтина, tiene una reducción de 10 pliegues en la enterotoxigenicidad en bucles ileales ligados de conejo, y una reducción del 50% e iniciación retardada de inducción de cAMP en células de mieloma cultivadas. Se demostró que LT(Δ 192-194) tiene actividad adyuvante aumentada para la inducción del suero IgG e IgA mucosa contra el virus del sarampión cuando se compara con LT nativa, LT-B o LT(E112K). LT(Δ 192-194) era eficaz cuando se administraba por vía intranasal, subcutánea, intraperitoneal u oral, aunque las respuestas IgA mucosas solo se demostraron luego de la



15

administración por vía mucosa. Estos investigadores también demostraron actividad adyuvante aumentada para LT(Δ 192-194) administrada por vía mucosa junto con KLH, BCG y Ova. Estos descubrimientos son consistentes con lo descubierto con LT(R192G).

3. RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una nueva molécula LT mutante que contiene una mutación adicional de leucina en la posición 211 frente a alanina (L211A).

Más particularmente, la presente invención proporciona una molécula LT novedosa, la LT(R192G/L211A), que exhibe la adyuvanticidad de LT(R192G), pero que sorprendentemente tiene una enterotoxigenicidad aún menor si se compara con una dosis grande de la holotoxina LT(R192G). Ver por ejemplo, la Figura 4. Se ha observado que 250 μ g de LT(R192G) tiene menos enterotoxigenicidad en el ensayo con ratones de la patente que 5 μ g de LT nativa. El mutante doble novedoso LT(R192G/L211A) tiene aún menos enterotoxigenicidad que LT(R192G) en el ensayo con ratones de la patente.

También se proporcionan métodos para utilizar LT(R192G/L211A) como adyuvante para la estimulación de una respuesta inmune contra un antígeno administrado en combinación con el adyuvante novedoso.

Anteriormente, se ha demostrado que LT(R192G) tiene la capacidad de realzar una respuesta inmune (por ej: IgG, IgA) frente a antígenos no relacionados con LT o con LT(R192G). Reciente evidencia experimental demuestra que LT(R192G) es útil como adyuvante para antígenos administrados por vía mucosa o parenteral; esta administración resulta en la producción del suero IgG y/o de sIgA mucosa, así como en respuestas inmunes mediadas por células contra el antígeno

16

con el cual se entrega LT(T192G) y lo que es más importante, como protección contra el desafío subsiguiente con organismos infecciosos.

Sorprendentemente se ha descubierto que si se modifica la leucina en la posición 211 de LT(R192G) frente a alanina, ello resulta en una enterotoxigenicidad aún más baja que LT(R192G), según medición hecha en el estudio para ratones de la patente (ver Figura 4). La nueva molécula, referida como LT(R192G/L211A), retiene la adyuvanticidad de LT(R192G), pero exhibe una enterotoxigenicidad aún más baja en el estudio para ratones de la patente, que la que exhibe LT(R192G).

La invención también proporciona una composición útil en los métodos para estimular una respuesta inmune. La composición consiste de una cantidad efectiva de LT(R192G/211A) en combinación con una cantidad efectiva del antígeno.

4. BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La presente invención puede entenderse en mayor detalle haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de la invención, a los ejemplos de las realizaciones específicas de la invención y a las figuras adjuntas, en las cuales:

La Figura 1 es un diagrama esquemático del plásmido pCS95, que codifica las subunidades LT A y B bajo el control del promotor lac. La Figura 1A ilustra la construcción del plásmido pCS95 que contiene la secuencia nucleótida que codifica el mutante LT(R192G). El plásmido pCS95 se construyó reemplazando el BamHI-XbaI de pBD95 con el fragmento BamHI-XbaI de pDF82. La mitad inferior de la Figura 1B muestra el cambio único de amino ácidos en LT(R192G), codificado por pCS95. La mitad superior de la Figura 1B muestra el cambio adicional de amino ácidos en

17

LT(R192G), que produce el plásmido pECD401 que codifica para LT(R192G/L211A). El plásmido pECDd401 proporciona la molécula LT(R192G/L211A), la cual contiene dos sustituciones de base, una en el residuo amino ácido 192 de la subunidad A que codifica la proteína Gly en lugar de la proteína Arg, y otro residuo de amino ácidos 211 de la subunidad A, que codifica para la proteína Ala en lugar de la proteína Leu. Todas las mutaciones fueron inducidas por mutagénesis dirigida en el sitio.

La Figura 2 muestra una porción de la secuencia de LT en la subunidad A, incluyendo una porción distal al sitio de separación de tripsina en la posición 192, incluyendo la leucina en la posición 211.

La Figura 3A y la Figura 3B muestran la sensibilidad de LT tipo silvestre y varios mutantes LT frente a la proteólisis de tripsina y pepsina.

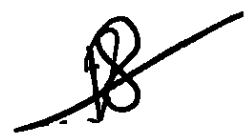
La Figura 4 muestra un ensayo intestinal de ratones de la patente que demuestra que LT(R192G/L211A) tiene menos toxicidad que una cantidad equivalente de LT(R192G). Para estos estudios se examinó la enterotoxicidad de LT(R192G) y de LT(R192G/L211A) en el ensayo en ratones de la patente. Grupos de ratones fueron inoculados por vía oral con LT nativa a 5, 25 o 125 µg, o con LT(R192G/L211A) a 125 o 250 µg, o con LT(R192G) a 25, 125 o 250 µg. Luego de un intervalo de tres horas se determinó la proporción intestino:cuerpo para cada animal. La relación intestino:cuerpo se define como el peso intestinal dividido por el resto del peso del cuerpo. Había tres animales por grupo y la Figura muestra el medio para cada punto de datos.

La Figura 5 demuestra que LT(R192G/L211A) funciona igual que LT(R192G) como un adyuvante inmunológico para inducción

del suero IgG cuando es administrado por vía intranasal. Los ratones fueron inmunizados intranasalmente con Ovalbumin (Ova) solo o junto con 5 µg de LT(R192G/L211A), LT8R192G) o LT nativa. El suero IgG anti-Ova se determinó por la prueba ELISA. Había siete animales por grupo y la Figura muestra el medio para cada punto de datos. Los ratones inmunizados por vía intranasal con Ova junto con LT(R192G) tuvieron respuestas IgG anti-Oval que no se distinguieron de los animales inmunizados con Ova junto con LT(R192G/L211A), o junto con LT nativa.

La Figura 6 es una demostración experimental en el sentido de que LT(R192G/L211A) tiene la misma capacidad que LT(R192G) para funcionar como adyuvante inmunológico para la producción de citoquinas tipo Th2 específicas de antígenos, específicamente IL-10, por células monocucleares de los bazo de los animales por vía intranasal. Los ratones fueron inmunizados intranasalmente con Ovalbumin (Ova) solo o junto con 5 µg de LT(R192G) o LT(R192G/L211A). Las citoquinas fueron determinadas por la prueba ELISA luego de un ensayo de re-estimulación de células T. Los ratones inmunizados por vía intranasal con Ova junto con LT(R192G) tuvieron respuestas IL-10 específicas de Ova, que no se distinguieron de los animales inmunizados con Ova junto con LT(R192G/L211A).

La Figura 7 es una demostración experimental en el sentido de que LT(R192G/L211A) tiene la misma capacidad que LT(R192G) de funcionar como un adyuvante inmunológico para la producción de citoquinas tipo Th2 específicas de antígenos, específicamente IFN-gamma, por células mononucleares de los bazo de los animales inmunizados por vía intranasal. Los ratones fueron inmunizados intranasalmente con Ova junto con LT(R192G) tuvieron respuestas IFN-gamma específicas de Ova



que no se distinguieron de los animales inmunizados con Ova junto con LT(R192G/L211A).

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una nueva molécula LT que contiene una glicina en la posición 192 en lugar de una arginina (R192G) y una mutación adicional de leucina en la posición 211 frente a alanina (L211A) de la subunidad A de LT y composiciones de lo mismo, y métodos para utilizar dichas composiciones como adyuvantes.

Se ha demostrado que el mutante LT(R192G) tiene enterotoxicidad reducida en el ensayo para ratones de la patente si se compara con la LT nativa (ver Figura 4). En un estudio aleatorio de escalonamiento de dosis controlado por placebo, 0 de 24 voluntarios demostraron reacciones adversas frente a dosis orales únicas de 2, 25 o 50 µg de LT(R192G). (Oplinger ML, Baqar S, Trofa AF, Clements JD, Gibbs P, Pazzaglia G, Bourgeois AL, Scott DA, 1997, *Safety and Immunogenicity in Volunteers of a New Candidate Oral Mucosal Adjuvant, LT(R192G)*, Abstr. G-10, pag 193, En: *Program and Abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.). Esto es en contraste con LT^r nativa, la cual se ha demostrado ser enterotóxica en 2,5 µg en voluntarios cuando se combina con la subunidad B/vacuna de cólera de célula total. Sin embargo, a 100 µg de LT(R192G), 2 DE 12 (16,7%) de los voluntarios desarrollaron diarrea media a moderada que se resolvió dentro de 24 horas.

La mutación atenuante en LT(R192G) está en el sitio donde se cree que ocurre la activación proteolítica por proteasas tipo tripsina en la molécula nativa, es decir, el



residuo de la proteína Arg sensible a tripsina dentro de la región subtendida por el bucle de disulfuro de la subunidad A. La tripsina no es la única proteasa que se encuentra en el tracto intestinal de los mamíferos. La pepsina es la principal enzima proteolítica en el jugo gástrico y funciona óptimamente en el pH ácido. Preferiblemente, la pepsina se separa en los enlaces de péptidos que involucran los grupos carboxílicos de los amino ácidos aromáticos y otros amino ácidos hidrofóbicos (especialmente fenilalanina y leucina). La pepsina no separará enlaces que contengan valina, alanina o glicina. Dentro de la región de la LT distal al sitio de separación de la tripsina en la posición 192 reside un sitio potencial de separación de pepsina, una leucina en la posición 211.

Utilizando la mutagénesis dirigida en el sitio, la leucina en la posición 211 de la LT nativa y de la LT(R192G) se reemplazó con un residuo de alanina, creando un mutante simple LT(L211A) y el mutante doble LT(R192G/L211A).

Tal como se demuestra en los Ejemplos siguientes (ver Sección 6.2), el mutante simple LT(L211A) retuvo la sensibilidad frente a la tripsina de LT nativa, mientras que el mutante doble LT(R192G/L211A) fue insensible a la separación de tripsina. Esto se esperaba puesto que el mutante simple LT(R192G) no es sensible a la separación de tripsina. De modo inesperado, los mutantes sencillos y dobles de LT así como LT nativa se encontraron ser resistentes a la separación de pepsina. De este modo, aunque el residuo de leucina en la posición 211 es un sitio potencial de separación de pepsina, no parece que funciona como tal.

El mutante LT(R192G) tiene una enterotoxigenidad sustancialmente reducida si se compara con LT nativa en el

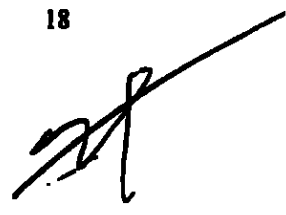
21

ensayo para ratones de la patente. 250µg de LT(R192G) tienen menos enterotoxigenidad en el modelo para ratones de la patente que 5 µg de LT nativa. Sin embargo, hay alguna cantidad de acumulación de fluidos. Sorprendentemente, aunque el residuo de leucina en la posición 211 no es un sitio de separación de pepsina y el mutante LT(L211A) retiene sensibilidad frente a la separación proteolítica por tripsina, el mutante simple LT(L211A) tiene también una enterotoxigenidad muy reducida, exhibiendo aproximadamente el mismo nivel de enterotoxigenidad que LT(R192G). Esencialmente, el mutante doble LT(R192G/L211A) no tiene enterotoxigenidad en este ensayo (ver Figura 4).

5.1 LT(R192G/L211A) Y COMPOSICIONES DEL MISMO

La presente invención abarca una composición y métodos para uso para fomentar la producción de suero y/o de anticuerpos mucosos así como respuestas inmunes mediadas por células contra antígenos que fueron administrados simultáneamente con una toxina bacteriana modificada genéticamente.

La toxina modificada es una forma de la enterotoxina lábil térmica (LT) de *E. coli* que mediante modificación de la arginina en la posición 192 frente a glicina y la modificación de la leucina en la posición 211 frente a arginina, ha perdido el sitio sensible a tripsina que une las subunidades A1 y A2, haciendo que la molécula no sea tóxica pero que pueda actuar como un adyuvante inmunológico. La invención está basada en el descubrimiento en el sentido de que LT(R192G/L211A) es útil como adyuvante para antígenos administrados por vía mucosa o parenteral; esta administración resulta en la producción de suero IgG y/o de sIgA mucosa, así como en respuestas inmunes mediadas por



22

células contra los antígenos con los cuales se entrega el mutante LT(R192G/L211A).

5.2 PRODUCCION DEL MUTANTE LT(R192G/L211A)

El mutante LT(R192G/L211A) puede ser producido por una serie de medios aparentes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, el plásmido pECD403, descrito completamente en el Ejemplo 6.1, puede ser utilizado para producir el mutante LT(R192G/L211A) sustancialmente puro en *E. coli*. El mutante LT(R192G/L211A) puede ser aislado por cromatografía de afinidad de agarosa de las bacterias que expresen un plásmido que codifique LT(R192G/L211A). Los expertos encontrarán aparentes otros métodos de purificación.

5.2.1 MODO DE ADMINISTRACION DEL MUTANTE LT/R192G/L211A) y

ANTIGENOS NO RELACIONADOS

De acuerdo con la presente invención, el mutante LT(R192G/L211A) puede ser administrado junto con cualquier antígeno y/o biológicamente relevante, de modo que se logre una respuesta inmune aumentada a dicho antígeno y/o vacuna. En una realización, el mutante LT(R192G/L211A) es un componente de una vacuna dirigido contra un organismo bacteriano enterotóxico.

En una realización preferida, el mutante LT(R192G/L211A) y el antígeno son administrados simultáneamente en una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del mutante LT(R192G/L211A) y una cantidad efectiva del antígeno. El modo de administración es por vía mucosa (es decir, intranasal, oral, rectal) o por vía parenteral (es decir, subcutánea, intramuscular, intradermal, intravenosa o intraperitoneal).

En una realización preferida, el mutante LT(R192G/L211A) y el antígeno son administrados por separado dentro de un corto intervalo de tiempo el uno del otro.

Las cantidades respectivas del mutante LT(R192G/L211A) y del antígeno variará dependiendo de la identidad de la ruta de administración, del antígeno empleado y de las especies animales que vayan a ser inmunizadas. En una realización, a la administración inicial del mutante LT(R192G/L211A) y del antígeno le sigue un refuerzo del antígeno respectivo. En otra realización no se da refuerzo. El tiempo de los refuerzos variará dependiendo de la ruta, del antígeno utilizado y de las especies que estén siendo tratadas. Las modificaciones en ruta, rango de dosis y tiempo del refuerzo para cualquier especie determinada y antígeno se pueden determinar fácilmente mediante experimentación rutinaria. El refuerzo puede ser de un antígeno solo o en combinación con el mutante LT(R192G/R211A).

La presente invención también proporciona un equipo útil en la producción de una respuesta inmune protectora en una célula anfitriona frente a un patógeno: el equipo consiste de una cantidad efectiva del antígeno y una cantidad efectiva de adyuvante del mutante LT(R192G/L211A).

5.3 ANTIGENOS UTILES EN LA INVENCION

Se pretende que los métodos y las composiciones de la presente invención sean para uso tanto en vertebrados maduros como inmaduros, en particular, pájaros, mamíferos y seres humanos. Los antígenos útiles, a modo de ejemplos y no como limitación, incluirían antígenos de cepas patogénicas de bacterias (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*,

23

Clostridium tetani, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema paladum*, *Treponema pertenue*, *Treponema caratense*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia* spp., *Helicobacter pylori*); hongos patógenicos (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*); protozoarios (*Entamoeba histolytica*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*); o helmínticos (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* y anquilostomas) presentados bien sea en el sistema inmune en forma de célula completa o aislados de los cultivos de los medios diseñados para crecer dichos organismos conocidos en la técnica, o antígenos

protectores de dichos organismos obtenidos a través de técnicas de ingeniería o por síntesis química.

Otros antígenos relevantes serían virus patogénicos (como ejemplos y no como limitación: *Poxviridae*, *Herpesviridae*, virus 1 de *Herpes Simplex*, virus 2 de *Herpes Simplex*, *Aenoviridae*, *papovaridiade*, *Enteroviridae*, *Picornaviridae*, *Parvoridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, virus de influenza, virus de parainfluenza, virus de paperas, sarampión, virus cincitial respiratorio, virus de rebella, *Arboviridae*, *Rhabdoviridae*, *Arenaviridae*, virus de Hepatitis A y de Hepatitis B, virus de Hepatitis E, virus de Hepatitis Nq a/No B, *Rhinoviridae*, *Coronaviridae*, *Rotoviridae* y Virus de Inmunodeficiencia Humana) presentados bien sea al sistema inmune completamente o en parte aislados de los cultivos de medios diseñados para crecer esos virus conocidos en la técnica o antígenos protectores de los mismos obtenidos mediante técnicas de ingeniería o síntesis química.

Otros ejemplos de antígenos relevantes incluyen, pero no están limitados a vacunas. Ejemplos de estas vacunas incluyen, pero no están limitados a vacuna contra influenza, vacuna contra tos ferina, difteria y tétano toxoide combinada con vacuna contra tos ferina, vacuna contra hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis E, vacuna contra encefalitis japonesa, vacuna contra herpes, vacuna contra sarampión, vacuna contra rubeola, vacuna contra paperas, vacuna combinada contra sarampión, paperas y rubeola, vacuna contra *papillomavirus*, vacuna contra la parvovirosis, vacuna contra el virus cincitial respiratorio, vacuna contra la enfermedad de Lyme, vacuna contra el polio, vacuna contra varicela, vacuna contra gonorrea, vacuna contra esquistosomiasis, vacuna rotavirica, vacuna contra micoplasma, vacuna contra neumococos, vacuna contra

meningococo, vacuna contra campilobacter, vacuna contra helicobacter, vacuna contra el cólera, vacuna contra el *E.coli* enterotoxigénico, vacuna contra *E.coli* enterohemorrágico, vacuna contra *Shigella*, vacuna contra *salmonella* y otras. Esas vacunas pueden ser producidas a través de procesos comunes. Por lo general, estas vacunas comprenden bien sea el organismo entero o el virus cultivado y aislado mediante técnicas conocidas por los expertos, o comprenden antígenos relevantes de estos organismos o virus que son producidos mediante técnicas de ingeniería genética o síntesis química. Su producción se ilustra, sin limitarse, en la siguiente forma:

Vacuna contra influenza: es una vacuna que consiste de todo o parte de heglutinina, neuraminidasa, nucleoproteína y proteína de matriz, las cuales se obtienen purificando un virus que crece en óvulos embrionados, con éter y detergente, o mediante técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

Vacuna contra tos ferina: es una vacuna que comprende todo o parte de una toxina de tos ferina, hemaglutinina y K-aglutinina las cuales se obtiene de una toxina avirulenta con formalina que se extrae mediante lavado o ultracentrifugación del caldo de cultivo o células bacterianas de *Bordetella*, o mediante técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

Difteria y tétano toxoide combinada con vacuna contra la tos ferina: es una vacuna mezclada con vacuna contra la tos ferina, difteria y tétano toxoide.

Vacuna contra encefalitis japonesa: es una vacuna que comprende todo o parte de una proteína antigénica la cual se obtiene cultivando un virus intracerebralmente en ratones y purificando las partículas del virus mediante centrifugación

Handwritten signature

2

o alcohol etílico e inactivando las mismas, o mediante técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

Vacuna contra Hepatitis B: es una vacuna que comprende todo o parte de una proteína antigénica la cual se obtiene aislado y purificando el antígeno HBs mediante salado o ultracentrifugación, obtenida de sangre que lleva hepatitis o mediante técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

Vacuna contra sarampión: es una vacuna que comprende todo o parte de un virus que crece en células cultivadas de embriones de pollo u óvulo embrionado, o un antígeno protector obtenido mediante ingeniería genética o síntesis química.

Vacuna contra la rubeola: es una vacuna que comprende todo o parte de un virus que crece en células cultivadas de embriones de pollo u óvulo embrionado, o un antígeno protector obtenido mediante ingeniería genética o síntesis química.

Vacuna contra paperas: es una vacuna que comprende todo o parte de un virus que crece en células cultivadas de embriones de pollo u óvulo embrionado, o un antígeno protector obtenido mediante ingeniería genética o síntesis química.

Vacuna combinada contra sarampión, rubeola y paperas: es una vacuna producida por la combinación de las vacunas contra el sarampión, rubeola y paperas.

Vacuna contra rotavirus: es una vacuna que comprende todo o parte de un virus que crece en células MA 104 cultivadas o aisladas de las heces del paciente, o un antígeno protector obtenido mediante técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

23

Vacuna contra micoplasma: es una vacuna que comprende todo o parte de las células de micoplasma que crecen en un medio de cultivo líquido de micoplasma o un antígeno protector obtenido mediante técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

La persona experta en la técnica encontrará obvias las condiciones para las cuales se puede lograr una prevención efectiva con el presente método.

Las composiciones de la preparación de la vacuna de la presente invención pueden prepararse mezclando los antígenos y/o vacunas arriba ilustrados con el mutante LT(R192G/L211A) en la relación deseada. Naturalmente, se deben retirar los pirógenos o alérgenos tan completamente como sea posible. La preparación del antígeno de la presente invención puede utilizarse preparando el antígeno de por sí y el mutante LT(R192G/L211A) juntos o separados.

Además, la presente invención incluye un equipo que consiste de una cantidad efectiva de antígeno y una cantidad de adyuvante efectiva del mutante LT(R192g/L211A). En uso, los componentes del equipo pueden mezclarse primero y luego administrarse o administrar los componentes por separado dentro de un corto intervalo de tiempo.

Las composiciones de preparación de la vacuna de la presente invención pueden combinarse con un vehículo farmacéutico líquido o sólido, y las composiciones pueden ser en forma de tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, suspensiones o soluciones. Las composiciones también pueden contener agentes preservativos, colorante y saboreantes adecuados, o agentes que produzcan una baja liberación. Los vehículos potenciales que pueden utilizarse en la preparación de las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero no están limitadas a cápsulas de gelatina,

29

azúcares, derivados de celulosa tales como carboximetil celulosa sódica, gelatina, talco, estearato de magnesio, aceite vegetal como aceite de maní, etc. glicerina, sorbitol, agar y agua. Los vehículos también pueden servir como ligantes para facilitar el entabletamiento de las composiciones para una conveniente administración.

6. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan únicamente a modo de ilustración y no pretenden limitar en modo alguno el alcance de la invención.

6.1 CONSTRUCCION DEL MUTANTE LT/R192G/L211A)

La toxina LT tipo silvestre es codificada en un plásmido que ocurre naturalmente y que se encuentra en las cepas del virus *E. coli* enterotoxigénico, capaz de producir esta toxina. Anteriormente, Clements y colaboradores habían clorado el gen LT de un asilado humano de *E. coli* designado H10407. Este subclón consiste de 5,2 kb de fragmento ADN tomado del plásmido de enterotoxina de H10407 introducido en el sitio *Pst*I del plásmido pBR322 (Clements y colaboradores, 1983, *Infect. Immun.* 40:653). Este plásmido recombinante, designado como pDF82, ha sido caracterizado ampliamente y expresa LT bajo control del promotor LT nativo. Según Clements y colaboradores, del plásmido pDF82 se deriva el plásmido pBD85, el cual se describe completamente en la Publicación PCT WO96/06627.

La Figura 1A muestra la construcción del plásmido pCS95, el cual se construyó introduciendo la corriente de la región reguladora de la subunidad LT-A de la región codificadora LT-A del plásmido pBD95. La Figura 1B muestra la mutación de Arg a Gly en la posición 192. Los sitios de restricción

BamHI y XbaI referidos en el diagrama como "nuevos", fueron agregados mediante mutagénesis dirigida en el sitio, tal como se describe en la Publicación PCT W096/06627. El nuevo sitio XbaI fue agregado mediante mutación silente, resultando en ninguna alteración de la secuencia amino ácida del péptido codificado por el gen.

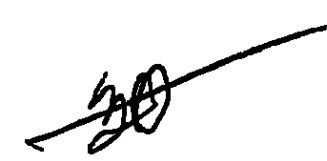
En seguida, comenzando con el plásmido mutante pCS95, se sustituyó Ala por Leu en la posición 211 (es decir, GCC = Ala reemplaza a CTC= Leu) por mutagénesis dirigida en el sitio. Luego, el mutante LT resultante se purificó mediante cromatografía de afinidad de agarosa de bacterias que expresan el plásmido mutado, denominado pECD403, confirmado por secuenciación.

En seguida, este mutante LT, designado como LT(R192G/L211A) fue examinado por electroforesis de gel SDS-poliacrilamida para modificación del enlace sensible a tripsina. Las muestras se examinaron con y sin exposición a tripsina y se compararon con LT nativo (sin modificar). El mutante LT(R192G/L211A) no se disocia en A₁ y A₂ cuando se incubaba con tripsina, indicando con ello que se ha retirado la sensibilidad a la proteasa.

6.2 EL MUTANTE LT(R192G/L211A) PRESENTA RESISTENCIA A LA SEPARACIÓN DE PEPSINA

Utilizando mutagénesis dirigida en el sitio, la leucina en la posición 211 de LT nativo y de LT(R192G) fue reemplazada con el residuo de alanina, creando un mutante LT(L211A) sencillo y el mutante doble LT(R192G/211A).

Luego de la purificación por cromatografía de afinidad de galactosa, ambas construcciones fueron examinadas mediante análisis SDS-PAGE. Tal como se muestra en la Figura 3, el mutante sencillo LT(L211A) retuvo la sensibilidad a la

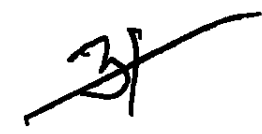


tripsina del LT nativo (comparar las franjas 1 y 2 del panel superior con las franjas 6 y 7), mientras que el mutante doble LT(R192G/L211A) fue insensible a la separación de tripsina (franjas 8 y 9 del panel superior). Esto se esperaba puesto que el mutante sencillo LT(R192G) no es sensible a la separación de tripsina (franjas 4 y 5 del panel superior). De manera inesperada, los mutantes tanto sencillo como doble de LT, al igual que el LT nativo se encontraron ser resistentes a la separación de pepsina. Por ello, aunque el residuo de leucina en la posición 211 es un sitio potencial para la separación de pepsina, no parece que funciona como tal.

6.3 ENTEROTOXICIDAD EN EL ENSAYO PARA RATONES DE LA PATENTE

Se examinó la enterotixicidad de los mutantes LT(R192G/L211A) y LT(L211A) en el ensayo para ratones de la patente. Como puede observarse en la Figura 4, el mutante LT(R192G) tiene una enterotoxicidad considerablemente reducida en comparación con el LT nativo en este ensayo. 250 µg del mutante LT(R192G) tienen menos enterotoxicidad en el modelo de ratón que 5 µg de LT nativo. Sin embargo, existe una pequeña cantidad de acumulación de fluido. De manera sorprendente, aunque el residuo de leucina en la posición 211 no es un sitio de separación de pepsina y LT(L211A) retiene la sensibilidad a la separación proteolítica por tripsina, el mutante sencillo LT(L211A) ha reducido enormemente también la enterotixicidad y aproximadamente el mismo nivel de enterotoxicidad que el mutante LT(R192G). Esencialmente, el mutante doble LT(R192G/L211A) no tiene enterotoxicidad en este ensayo.

6.4 ADYUVANTICIDAD DE LT(R192G/L211A)



Se seleccionó Ovalbumin (Ova) como un antígeno representativo de estos estudios. Una serie de investigaciones, incluidas la nuestra (Clements y colaboradores, 1988, *Vaccine* 6:269-277; Dickinson y Clements, 1996, *Mucosal Vaccines* :73-87; Dickinson y Clements, 1995, *Infection and Immunity*, 63:1617-1623; Tsuji y colaboradores, 1997, *Immunology* 90:176-182; Yamamoto y colaboradores, 1997, *Journal of Experimental Medicine* 185:1203-1210; Yamamoto y colaboradores, 1997, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:5267-5272; DiTommaso y colaboradores, 1996, *Infection and Immunity* 64:974-979; Douce y colaboradores, 1995, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:1644-1648; Douce y colaboradores, 1997, *Infection and Immunity* 65:2821-2828), han utilizado esta proteína y ello provee una referencia útil y necesaria para comparación con otros estudios. Para esos estudios se examinaron tanto las respuestas de suero anti-Ova IgG como las respuestas de célula T específicas de Ova.

Los ratones fueron inmunizados intranasalmente con Ova solo o con 5 µg de LT(R192G) o LT(R1902G/L211A). El suero anti-Ova IgG se determinó mediante análisis ELISA. En cada grupo había siete animales y se muestran los medios para cada punto de datos. Tal como se muestra en la Figura 5, los ratones inmunizados con Ova por vía intranasal junto con LT(R192G) tuvieron respuestas de suero anti-Ova IgG que no se distinguieron de los animales inmunizados con Ova junto con LT(R192G/L211A). Cuando se examinaron las respuestas de célula T específicas de estos animales, tanto las respuestas anti-Ova de Th2/IL-10 (Figura 6) como de Th1/IFN-gamma (Figura 7) fueron equivalentes cuando se utilizó LT(R192G) o LT(R192G/L211A) en la formulación adyuvante. No hubo una

diferencia significativa en las respuestas IFN-gamma e IL-10 entre estos dos grupos.

7. DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

El siguiente microorganismo que contenía el plásmido designado fue depositado en la ATCC (American Type Culture Collection), (dirección: 1081 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) el 13 de marzo de 1998, y le fue asignado el siguiente número de acceso:

<u>Microorganismo</u>	<u>Número de acceso</u>
E. coli JM83 pECD403	98697

Aunque la invención ha sido descrita en detalle haciendo referencia a las realizaciones específicas de la misma, se entenderá que algunas variaciones funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Sin duda, varias modificaciones de la invención, además de las que ilustra y describe este contexto serán aparentes para los expertos en la técnica a partir de la anterior descripción y de los dibujos adjuntos. Estas modificaciones pretenden caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

El contenido de las diversas publicaciones que cita este contexto se incorpora por referencia en su totalidad.



REIVINDICACIONES

34

1. Una composición que comprende un mutante de una holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli*, en la cual la arginina en la posición amino ácida 192 es reemplazada con glicina y en la cual la leucina en la posición amino ácida 211 es reemplazada con alanina; dicha holotoxina tienen actividad adyuvante inmunológica y es:

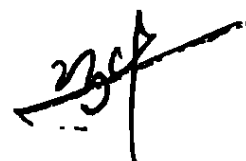
- a) 100 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli* según medición en el ensayo de la célula adrenal Y-1,
- b) 50 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli* según medición en el ensayo para ratones, y
- c) menos tóxica que una composición consistente de LT(R192G) aislado según medición en el ensayo para ratones.

2. La composición de la reivindicación 1, en la cual la holotoxina es codificada por el plásmido que se obtiene de la bacteria con el Numero de Acceso de ATCC 98687, plásmido que expresa tanto la subunidad A como la subunidad B de la enterotoxina lábil térmica de *E. coli*.

3. Una preparación que comprende un antígeno en combinación con la composición según la reivindicación 1.

4. La preparación según la reivindicación 3, en la cual el antígeno es seleccionado del grupo de antígenos consistentes de antígenos bacterianos, fungales, protozoales, virales, helmínticos y otros antígenos patogénicos microbianos.

5. La preparación según la reivindicación 4, en la cual el antígeno es seleccionado del grupo consistente de



Streptococcus pyogenes, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema paladum*, *Treponema pertenue*, *Treponema caratenum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia* spp., *Helicobacter pylori*); hongos patogénicos (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*); protozoarios (*Entamoeba histolytica*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*); o helmínticos (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, antígenos de virus de la viruela, virus de la vacuna, virus de viruela, virus de varicella-

36

zoster, virus de Herpes Simplex, virus de Herpes Simplex 2, virus de influenza, virus de parainfluenza, paperas, sarampión, virus cincitial respiratorio, virus de rubeola, virus de Hepatitis A, virus de Hepatitis B, virus de Hepatitis C, virus de Hepatitis E y virus de Hepatitis No A y No B.

6. Una composición útil en la producción de una respuesta inmune protectora a un patógeno en una célula anfitriona, que consiste en la mezcla de una cantidad efectiva de un antígeno y una cantidad efectiva de adyuvante de la composición según la reivindicación 1.

7. Un equipo útil en la producción de una respuesta inmune protectora en una célula anfitriona a un patógeno que comprende dos componentes: (a) una cantidad efectiva del antígeno, y (b) una cantidad efectiva de adyuvante de un mutante de la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli*, en la cual la arginina en la posición amino ácida 192 es reemplazada con glicina, y en la cual la leucina en la posición amino ácida 211 es reemplazada con alanina; la holotoxina tiene actividad adyuvante inmunológica, y es:

- a) 100 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *R. coli* según medición en el ensayo de la célula adrenal Y-1,
- b) 50 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli* según medición en el ensayo para ratones, y
- c) menos tóxica que una composición consistente de LT(R192G) aislado según medición en el ensayo para ratones.

8. Un método para crear o sostener una respuesta inmune protectora o adaptiva frente a un antígeno en una

37

célula anfitriona, que consiste en administrar por vía oral una mezcla de una cantidad efectiva de un antígeno y una cantidad efectiva de un mutante de la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli*, en la cual la arginina en la posición amino ácida 192 es reemplazada con glicina y en la cual la leucina en la posición amino ácida 211 es reemplazada con alanina; la holotoxina es 100 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli* nativa según medición en el ensayo de célula adrenal Y-1, 50 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli*, nativa según medición en el ensayo para ratones, y menos tóxica que las composiciones de LT(R192G) aislado según medición en el ensayo para ratones, en un vehículo farmacéuticamente aceptable por vía oral.

9. El método de la reivindicación 8, donde se produce una respuesta de suero.

10. El método de la reivindicación 8, donde se produce una respuesta inmune mediada por célula.

11. El método de la reivindicación 8, donde se produce una respuesta mucosa.

12. El método de la reivindicación 8 que además consiste en administrar un refuerzo del antígeno.

13. El método de la reivindicación 8, donde el antígeno se deriva del grupo consistente de bacterias, virus, protozoarios, hongos, helmínticos y otros patógenos microbianos.

14. Un método para inducir una respuesta inmune frente a un antígeno en una célula anfitriona, que consiste en administrar por vía oral una cantidad efectiva de un antígeno junto con una cantidad efectiva de adyuvante de un mutante de la holotoxina enterotoxina lábil térmica *E. coli*, en la cual

la arginina en la posición amino ácida 192 es reemplazada con glicina, y en la cual la leucina en la posición amino ácida 211 es reemplazada con alanina; la holotoxina tiene actividad adyuvante inmunológica, y es:

- a) 100 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *R. coli* según medición en el ensayo de la célula adrenal Y-1,
- b) 50 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli* según medición en el ensayo para ratones, y
- c) menos tóxica que una composición consistente de LT(R192G) aislado según medición en el ensayo para ratones.

15. El método de la reivindicación 14, en el cual antígeno y la holotoxina son administrados simultáneamente.

16. El método de la reivindicación 14, en el cual el antígeno y la holotoxina son administrados por separado dentro de un corto intervalo de tiempo.

17. Un método para inducir una respuesta inmune protectora contra un organismo bacteriano enterotóxico que consiste en administrar un mutante de la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E.coli*, en la cual la arginina en la posición amino ácida 192 es reemplazada con glicina, y en la cual la leucina en la posición amino ácida 211 es reemplazada con alanina; la holotoxina tiene actividad adyuvante inmunológica, y es:

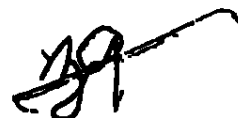
- a) 100 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *R. coli* según medición en el ensayo de la célula adrenal Y-1, y

b) menos tóxica que una composición consistente de LT(R192G) aislado según medición en el ensayo para ratones,

como un componente de una vacuna dirigida contra el organismo bacteriano enterotóxico.

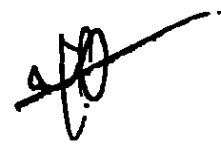
18. El método de la reivindicación 17, donde el organismo bacteriano enterotóxico es seleccionado del grupo consistente de organismos bacterianos enterotóxicos que expresan una toxina del tipo del cólera.

19. El método de la reivindicación 17, donde el organismo bacteriano enterotóxico es seleccionado del grupo cónsistente de *Escherichia* spp. Y *Vibrio* spp.



RESUMEN

La presente invención está dirigida hacia una composición novedosa la cual es un mutante genéticamente distinto de la enterotoxina lábil térmica de *E. coli*. Específicamente, el mutante LT designado como LT(R192G/L211A) es modificado por dos sustituciones de amino ácidos, es decir, la arginina en la posición amino ácida 192 es reemplazada por glicina y la leucina en la posición amino ácida 211 es reemplazada por alanina. La invención se refiere a composiciones y métodos para uso del mutante doble novedoso de LT como adyuvante.



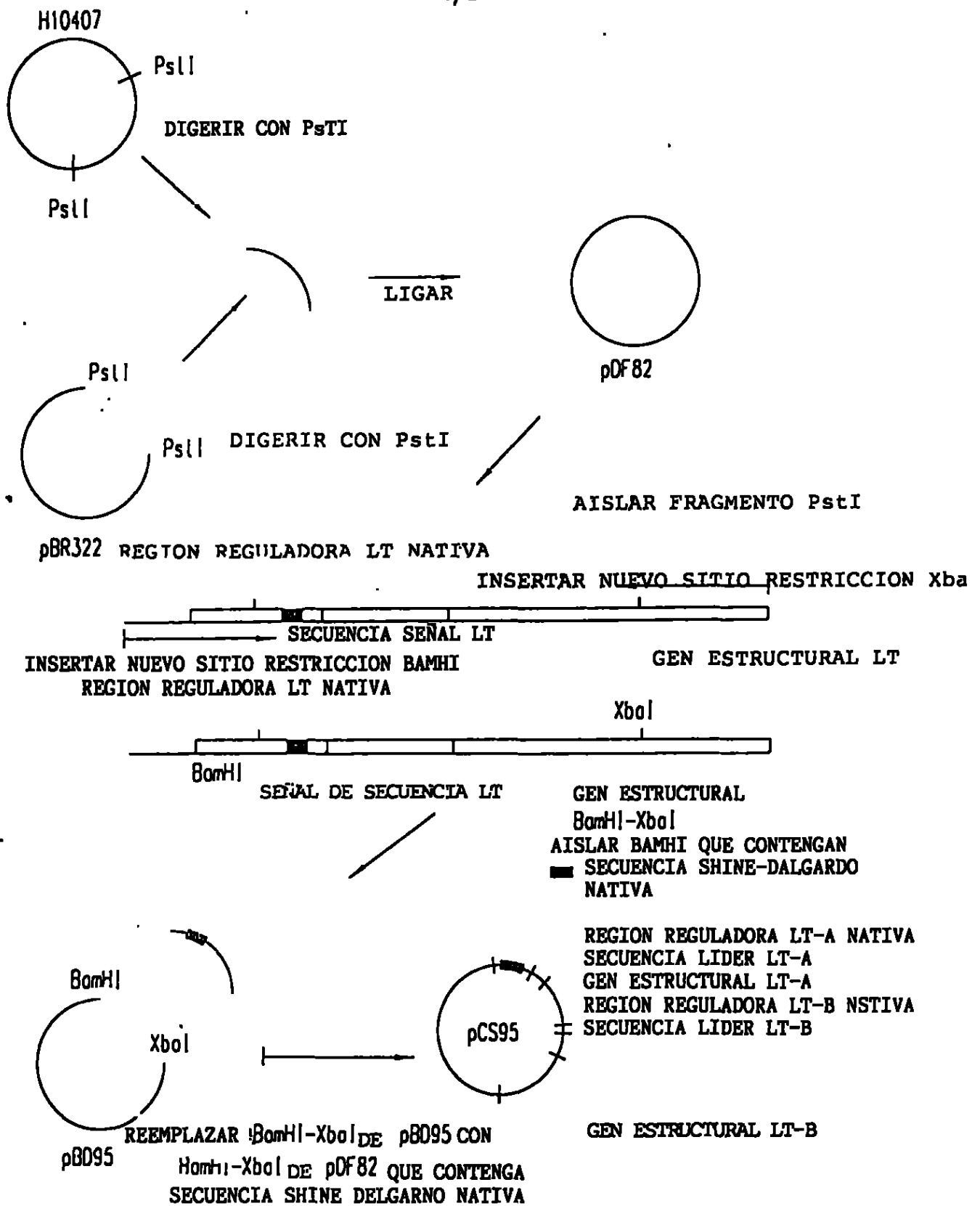


FIG. 1A

41

42

2/8

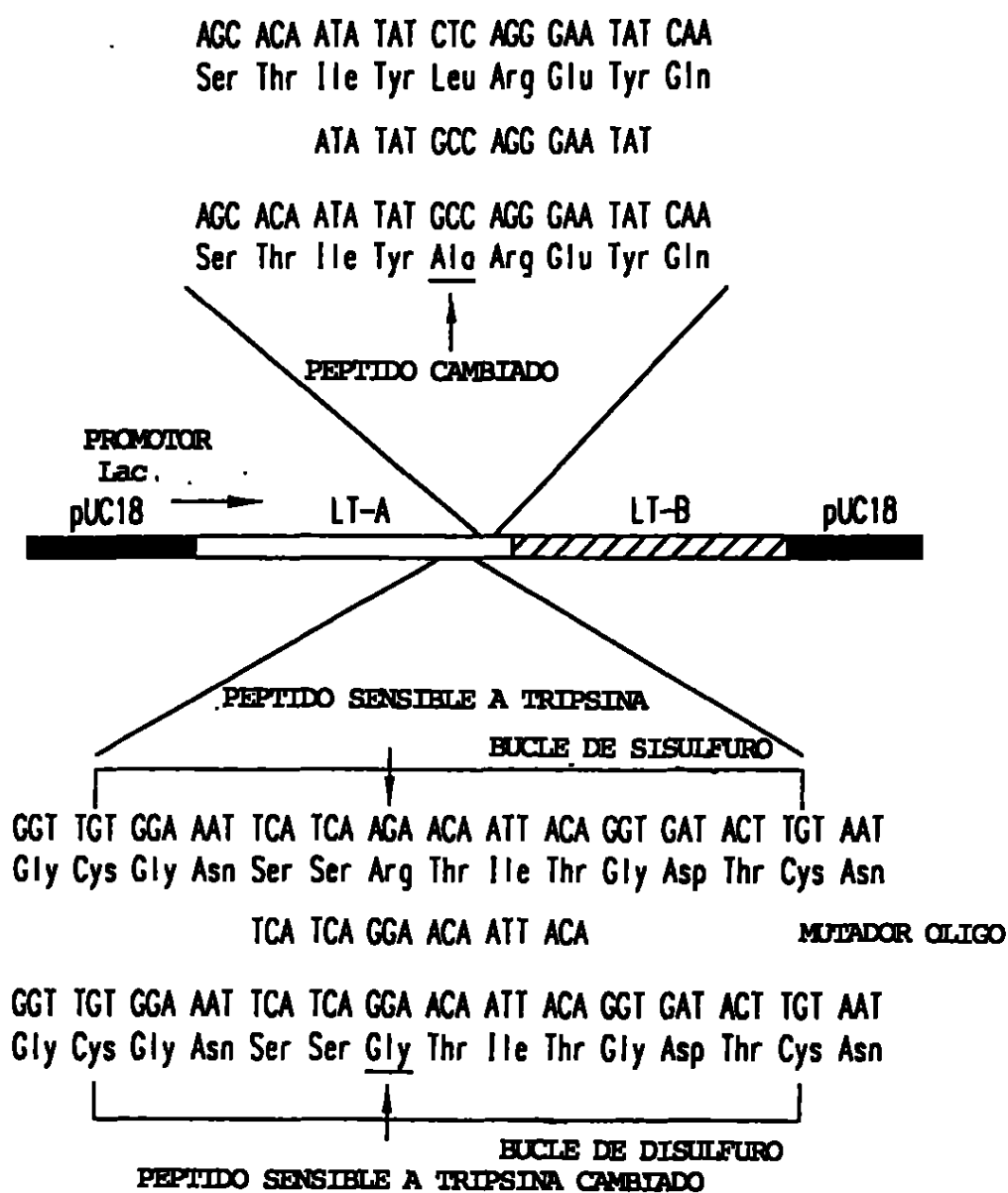
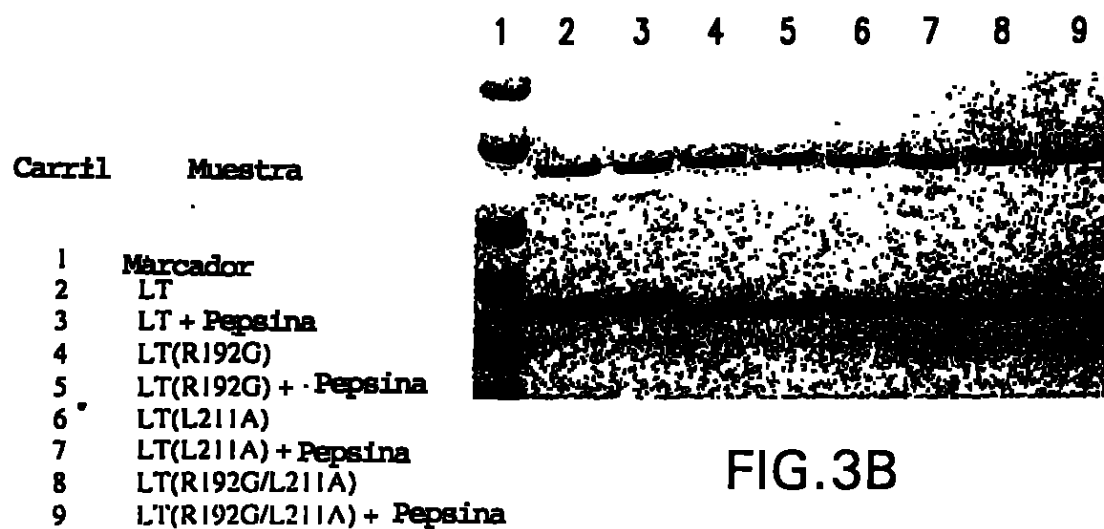
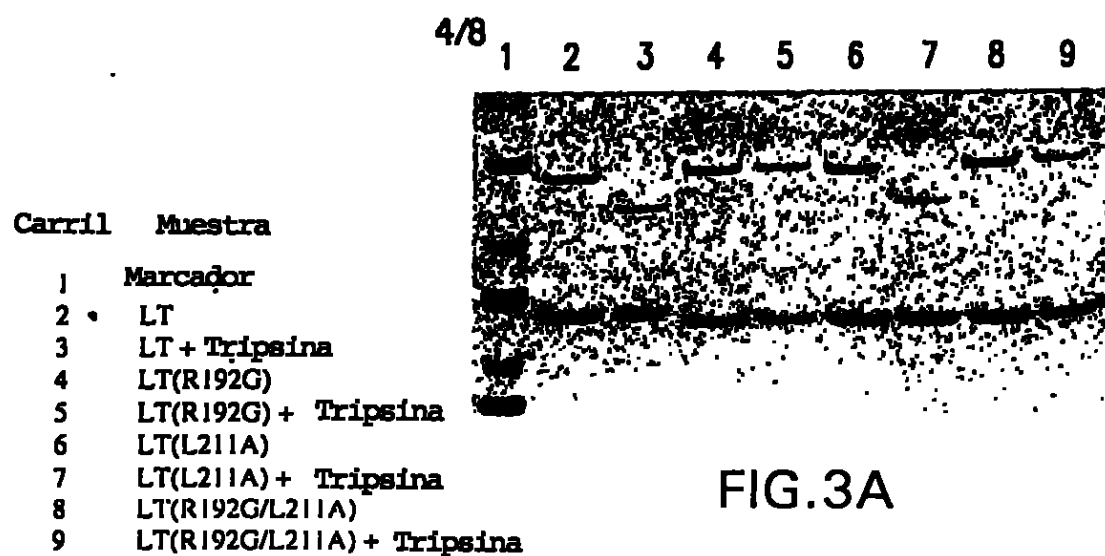
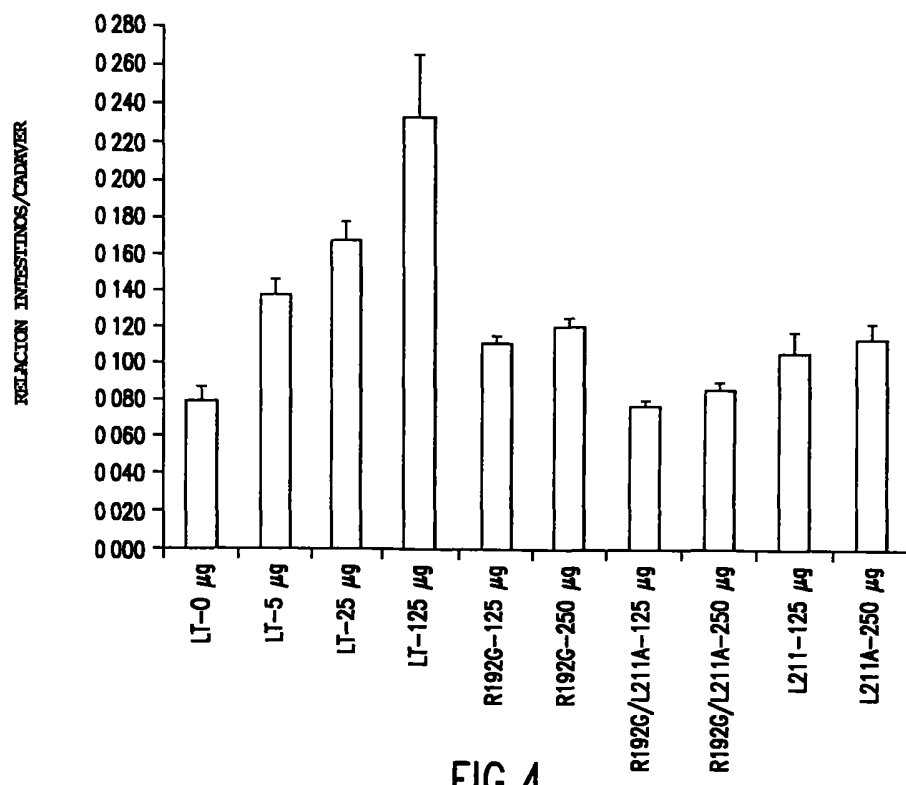


FIG. 1B

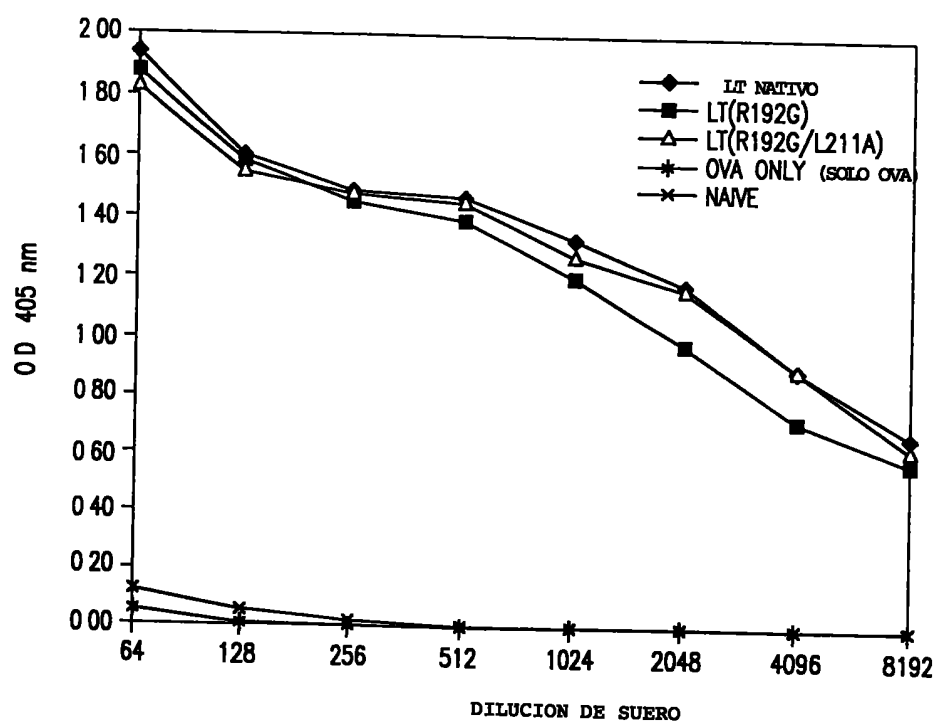
421





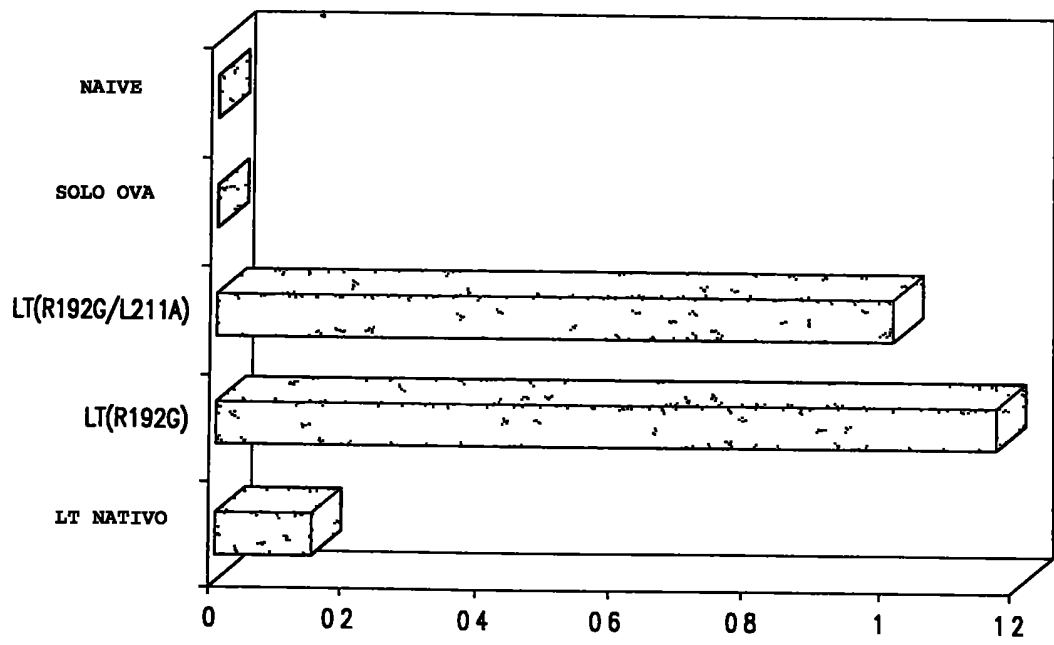
~~44~~

~~2~~



8/9

FIG.5



7/8

FIG 6

JS

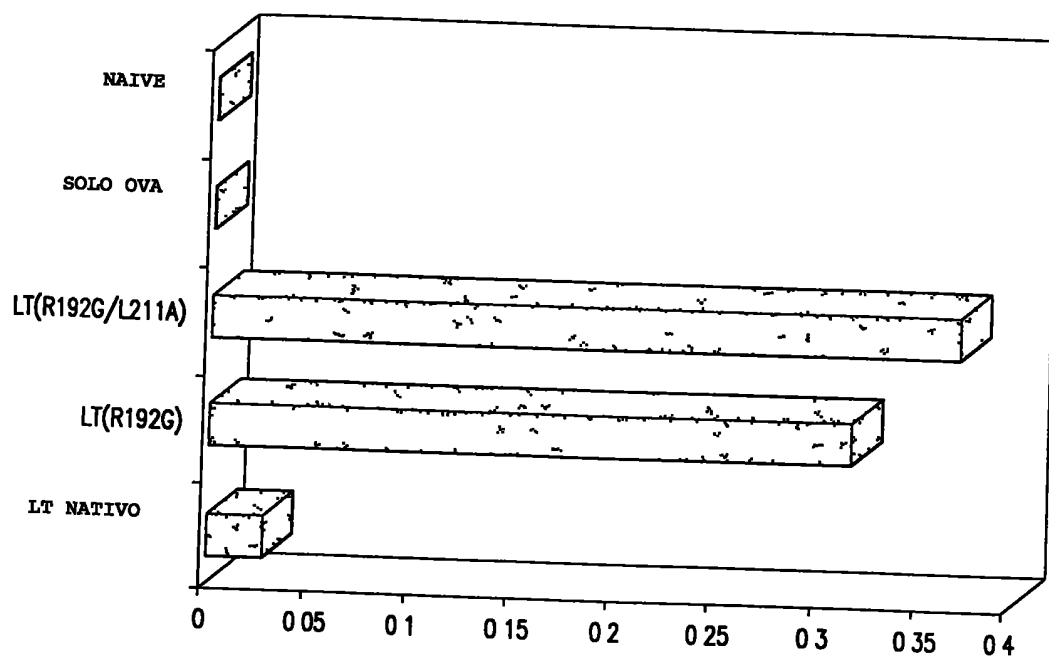


FIG.7

47

8/8

47

7. Un equipo útil en la producción de una respuesta inmune protectora en una célula anfitriona a un patógeno que comprende dos componentes: (a) una cantidad efectiva del antígeno, y (b) una cantidad efectiva de adyuvante de un mutante de la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli*, en la cual la arginina en la posición amino ácida 192 es reemplazada con glicina, y en la cual la leucina en la posición amino ácida 211 es reemplazada con alanina; la holotoxina tiene actividad adyuvante inmunológica, y es:

- a) 100 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli* según medición en el ensayo de la célula adrenal Y-1,
- b) 50 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli* según medición en el ensayo para ratones, y
- c) menos tóxica que una composición consistente de LT(R192G) aislado según medición en el ensayo para ratones.

8. Un método para crear o sostener una respuesta inmune protectora o adaptiva frente a un antígeno en una célula anfitriona, que consiste en administrar por vía oral una mezcla de una cantidad efectiva de un antígeno y una cantidad efectiva de un mutante de la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli*, en la cual la arginina en la posición amino ácida 192 es reemplazada con glicina y en la cual la leucina en la posición amino ácida 211 es reemplazada con alanina; la holotoxina es 100 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli* nativa según medición en el ensayo de célula adrenal Y-1, 50 veces menos tóxica que la holotoxina enterotoxina lábil térmica de *E. coli*, nativa según medición en el ensayo

51

para ratones, y menos tóxica que las composiciones de LT(R192G) aislado según medición en el ensayo para ratones, en un vehículo farmacéuticamente aceptable por vía oral.

50. 33

Industria y Comercio

Radicación: 00015738 00000000

Folios: 32 V C I A

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTAR

Fecha (AMB): 2002-01-25 17:17:14

Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [✓]

MODELO DE UTILIDAD

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Descripción de la invención
- Dibujos de ser estos pertinentes
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas

[] []

[] [✓]
[] [✓]
[] [✓]
[] [✓]
[] [✓]

COMPLETA [✓]

INCOMPLETA

[] []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño.
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.

[] []
[] []
[] []
[] []

COMPLETA []

INCOMPLETA

[] []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado.
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.
- Representación gráfica del esquema de trazado
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.

[] []
[] []
[] []
[] []

COMPLETA []

INCOMPLETA

[] []


Firma Responsable

Fecha: _____

Recibido el 27/01/2002 a las 14:00 horas
Controlador 270249
Bogotá D.C. Colombia

54
51

ACCION: Consultar Siguiete Anterior Ir al detalle Primero ...
Seleccionar un(os) Registros

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
SISTEMA DE REGISTRO

Fecha 12/03/2002

MANTENIMIENTO DE PROTOCOLOS

Numero : 18293

Fecha : 22/04/1998

Conferido: THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND

Pais : US ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Ciudad : 285 NEW ORLEANS (LOUISIANA).

Represent: S Sustituir: S Desistir: S

No. Radicacion : 98 22150 Clase: 0 Seev: 0 Seac: 0

scncia	Codigo	Ctr	Nombre
1	126	C	CASTILLO GRAU GERMAN
2	4933		CASTILLO GIBSONE ADRIANA
3	5371		CASTILLO GIBSONE LUIS FELIPE

Encontrados (1/1) registro(s)

Folio 55

2020
Bogotá, D. C.

Doctor(a)
GERMAN CASTILLO GRAU
Apoderado(a)

Oficio No. 09425

REFERENCIA: Radicación 02-5738
Trámite 002
Evento 001
Actuación 430
Folios 001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe indicarse el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art. 27-c, D 486/00).
- Debe allegar el documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por los inventores al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).
- Se recuerda al interesado que el formulario de solicitud debe diligenciarse en su totalidad, y que la modalidad de la solicitud hace parte integral del mismo, razón por la cual debe confirmar a qué modalidad se refiere la presente solicitud.
- Para efectos de entendimiento, y posterior digitalización de la solicitud es importante que los documentos aportados sean enteramente legibles, por lo tanto se sugiere aportar un nuevo extracto para publicación ya que el aportado con la solicitud no es legible en algunas partes.

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, en concordancia con el artículo 85 de la misma decisión, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución 210 del 15 de enero del 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 MAR. 2002

202027