

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 532**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2000 E 00992122 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014 EP 1221970**

54 Título: **Composiciones y métodos para estimular una respuesta inmune contra agentes infecciosos**

30 Prioridad:

**18.10.1999 US 160028 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.05.2014**

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.  
(100.0%)  
4560 HORTON STREET  
EMERYVILLE, CA 94608, US**

72 Inventor/es:

**BARACKMAN, JOHN D.;  
OTT, GARY;  
PINE, SAMUEL y  
O'HAGAN, DEREK**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 462 532 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

Composiciones y métodos para estimular una respuesta inmune contra agentes infecciosos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones y usos para estimular una respuesta inmune contra influenza. Específicamente, la invención se refiere a composiciones orales que contienen antígeno de hemaglutinina de un virus de influenza y al menos una enterotoxina termolábil mutante de *Escherichia coli* como se define en las reivindicaciones.

10 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades infecciosas son responsables de una significativa morbilidad y mortalidad en todo el mundo. El tratamiento de una enfermedad infecciosa a menudo se inicia después de que el paciente se haya infectado y ya haya sufrido los efectos de la infección. Durante mucho tiempo se ha necesitado desarrollar estrategias para prevenir infección antes de que ocurran efectos perjudiciales o infecciosos.

La mayoría de enfermedades infecciosas se adquieren por medio de superficies mucosales. Las inmunoglobulinas A (IgA) secretoras pueden funcionar como una primera línea de defensa contra tales infecciones, previniendo la unión y transmisión a través de la mucosa, y pueden inhibir la réplica viral en las células epiteliales infectadas.

Una enfermedad infecciosa de importancia particular es influenza. La influenza es una enfermedad humana seria que muestra una elevada mortalidad en poblaciones vulnerables tales como las muy jóvenes, las muy mayores e individuos inmunocomprometidos, así como una significativa morbilidad en la población general (Glezen P. W. (1982) *Epidemol. Rev.* 4:25-44). Los costes sociales y económicos asociados con los brotes de influenza anualmente son altos (Clements M. L. e I. Stephens. "Vacunas nuevas y mejoradas contra influenza" en *NEW GENERATION VACCINES*, 2ª edición (Levine M. M. et al. Eds). Marcel Dekker. Inc. Nueva York, 1997, páginas 545-570). Las vacunas intramusculares (i.m) con virus entero inactivado con formalina y virus de segunda generación están disponibles en el mercado para controlar la propagación y severidad de influenza (Ghendon Y. (1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 257:37-45; Riddiough M. A. et al. (1983) *JAMA* 249:3189-95). Estas vacunas profilácticas, aunque son agentes importantes en el control de influenza, sufren un número de defectos que limitan su eficacia y aceptabilidad. Las vacunas de influenza comerciales actuales demuestran inducir respuestas de anticuerpo de suero en humanos adultos sanos que están protegidos contra desafío viral, pero, esta inmunidad protectora tiende a ser variable en potencia y tiene una vida relativamente corta, particularmente en las poblaciones de niños y ancianos (Clements M.L. e I Stephens (1997) páginas 545-70; Ghendon Y. (1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 257:37-45; Riddiough M. A. et al. (1983) *JAMA* 249:3189-3195; Hoskins T. W. (1979) *Lancet* i:33-35. Patriarca P. A. et al. (1985) *JAMA* 253:1136-1139). Además, las vacunas con virus entero inactivado y virus de segunda generación son conocidas por activar respuestas de linfocito T citotóxico CD8<sup>+</sup> (LCT) solamente esporádicamente, tienen reactividad cruzada pobre con variantes antigénicas, y producen respuestas de IgA secretoras pobres (Glezen P. W. (1982) *Epidemol. Rev.* 4:25-44; Clements M. L. e I. Stephens (1997) páginas 545-570; Bender B. S. et al. (1991) *Immunol.* 72:514-519; Hoskins, T. W. (1979) *Lancet* i:33-5; Patriarca P. A. et al. (1985) *JAMA* 253:1136-39; Powers D. C. (1993) *J. Am. Geriatr. Soc.* 41:1-5). Además, la reactividad en el sitio de inyección y las respuestas inmunes débiles pueden ser un problema en niños muy pequeños (Groothuis J. R. et al. (1994) *Vaccine* 12:139-41; Groothuis J. R. et al. (1991) *Pediatrics* 87:823-828). Actualmente se buscan esfuerzos significativos para mejorar la eficacia y tolerabilidad de vacunas principalmente a través del desarrollo de vacunas para influenza mucosamente activas (Clements M.L e I. Stephens (1997) páginas 545-570; Barackman J. D. et al. (1999) *Infect. Immun.* 67:4276-4279; De Haan A. et al. (1995) *Vaccine* 13:155-162; Oh Y. et al. (1998) *Vaccine* 10:506-511; Santiago N. et al. "Vehicles for oral immunization" en *VACCINE DESIGN: THE SUBUNIT AND ADJUVANT APPROACH*. Powell F. M. y M. J. Newman (Eds). Plenum Press, Nueva York, 1995, páginas 413-38).

Las estrategias de inmunización mucosal se han investigado de manera extensa como un medio para mejorar la eficacia y duración de vacunación de influenza proporcionando una respuesta inmune más amplia que la permitida por la inmunización i.m (Oh Y. et al. (1998) *Vaccine* 10:506-511; Gallichan W. S. y K. L. Rosenthal (1996) *J. Exp. Med.* 184:1879-1890; Ogra P. L. "Inmunoprofilaxis mucosal: un resumen introductorio" en *MUCOSAL VACCINES*, Kiyono H. et al. (Eds.) Academic Press, Nueva York, 1996, páginas 3-14; Novak M. et al. (1995) *Adv. Exp. Med. Biol.* 371B:1587-1590; Staats H. F. y J. R. McGhee. "Aplicación de principios básicos de inmunidad mucosal para el desarrollo de vacuna" en *MUCOSAL VACCINES*, Kiyono H. et al. (Eds.) Academic Press, Nueva York, 1996, páginas 17-399. La estrategia más comúnmente empleada, y por lo tanto la más exitosa, para la vacuna de influenza es a través de la ruta intranasal (Barackman J. D. et al. (1999) *Infect. Immun.* 67:4276-4279; Nichol K. L. et al. (1999) *JAMA* 282:137-144; Rudin A. et al. (1998) *Infect. Immun.* 66:3390-3396; Takase H. et al. (1996) *Vaccine* 14:1651-1656).

La inmunización intranasal con vacunas de virus de influenza vivas adaptadas al frío, y la co-administración de antígenos de influenza con subunidades de enterotoxina termolábil (TL) y TCB (subunidad B no tóxica de la

toxina colérica) parecen ser técnicas viables para el desarrollo de vacunas mejoradas de influenza (Dickinson B. L. y J. D. Clements "Uso de enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* como un adyuvante oral" en MUCOSAL VACCINES, Kiyono H. et al. (Eds.) Academic Press, Nueva York, 1996, páginas 73-87; Nichol K. L. et al (1999) JAMA 282:137-144). Estas técnicas han demostrado en humanos aumentar los niveles locales (salivales y respiratorios altos) de IgA específico de antígeno, así como mayores respuestas inmunes celulares en comparación con la inmunización i.m. tradicional con las vacunas de influenza comerciales. Las vacunas del virus de influenza vivas adaptadas al frío han demostrado, sin embargo, tener una eficacia limitada en pacientes ancianos, y han demostrado ser estimuladores pobres de LCT en niños (Mbawuiké I. N. et al. (1996) J. Med. Virol. 50:105-111; Treanor J. et al. (1994) J. Infect. Dis. 169:402-407). La toxicidad ha sido el factor limitador principal para el uso de enterotoxinas como adyuvantes mucosales en humanos. La administración intranasal de antígenos de influenza con LT-K63 es conocida por Barchfeld et al. (1999) Vaccine 17: 695-704. Una combinación de hemaglutinina de influenza y mutantes de LT es conocida por WO98/42375 para administración parenteral.

La inmunización oral ha sido durante mucho tiempo un objetivo deseable para la vacunación. Como la inmunización intranasal, la inmunización oral ha demostrado inducir respuestas fuertes de IgA secretora, mejorar las respuestas inmunocelulares protectoras y dar como resultado también significativas respuestas de anticuerpo de suero (Takase H. et al. (1996) Vaccine 14:1651-1656; Benedetti R. et al. (1998) Res. Immunol. 149:107-118; Gallichan W. S. y K. L. Rosenthal (1996) J. Exp. Med. 184:1879-1890; Novak M. et al. (1995) Adv. Exp. Med. Biol. 371B:1587-1590; Katz J. M. et al. (1997) J. Infect. Dis. 175:352-363). Las respuestas de IgA secretora para inmunización oral han demostrado en algunos modelos de animales ser más fuerte en los tractos urogenitales y rectales, y, cuando se compara con inmunización intranasal, amortiguaron de alguna manera las respuestas respiratorias altas, nasofaringeales y salivales (Rudin A. et al. (1998) Infect. Immun. 66:3390-3396). Estas respuestas de IgA respiratorias altas relativamente débiles, si resulta que es el caso en el sistema humano, parecerían ser un problemas con respecto a conseguir protección efectiva contra el desafío viral contra virus cuyo principal modo de entrada es a través del tracto respiratorio superior (tal como influenza). Sin embargo, otros estudios han demostrado que hay suficientes respuestas de IgA secretora local, y lo que es más importante, evidencia de migración de células B y T con cebo de antígeno a los sitios respiratorios altos para inducir una potente inmunidad protectora (Takase H. et al. (1996) Vaccine 14:1651:1656; Katz J. M. et al. (1997) J. Infect. Dis. 175:352-363). Además, la inmunización oral ha demostrado promover el mantenimiento de célula B de memoria en la médula ósea, un factor que puede ser importante en el desarrollo de la persistencia de inmunidad contra desafío viral (Benedetti R. et al. (1998) Res. Immunol. 149:107-118). Sin embargo, para obtener fuertes respuestas inmunes de muchos antígenos, debe co-administrarse un adyuvante mucosal potente, normalmente una enterotoxina (De Aizpurua H. J. et al. (1998) J. Exp. Med. 167:440-451). Del Giudice et al. (1999) Methods, 19: 148-55 muestra la administración intragástrica de antígenos con LT-K63 pero no menciona influenza.

Estudios han demostrado que las respuestas inmunes a antígenos oralmente inmunizados fueron significativamente más fuertes si el antígeno tenía por sí mismo propiedades de enlace mucosal, o podría hacerse para tener propiedades de enlace mucosal mediante acoplamiento químico con agentes con lectina mucoadhesiva o propiedades de enlace al receptor (Harokopakis E. et al. (1998) Infect. Immun. 66:4299-4304; Neutra M. R. y J. Kraekenbuhl "Absorción de antígeno por células M para vacunas mucosales efectivas" en MUCOSAL VACCINES Kiyono H. et al. Eds. Ogra PL. McGhee JR, eds. Mucosal Vaccines. Nueva York: Academic Press 1996:41-55, De Aizpurua H. J. y G. J. Russell-Jones (1998) J. Exp. Med. 167:440-451; Czerkinsky C. et al. (1989) Infect. Immun. 57:1072-1077). TCB se ha usado para estos fines con algo de éxito (De Aizpurua H. J. y G. J. Russell-Jones (1988) J. Exp. Med. 167:440-451; Czerkinsky C. et al. (1989) Infect. Immun. 57:1072-1077). Las hemaglutininas de influenza (HA) son glicoproteínas de membrana de virus de influenza que aglutinan eritrocitos, y median la unión viral y la fusión de membrana. La HA de influenza se enlaza con glicoproteínas ricas en ácido neuramínico, mientras LT-R72 y LT-K63 se enlazan con GM1-gangliósido, así como glicoproteínas y lipopolisacáridos que contienen galactosas, cuyos ligandos se encuentra ubicuamente en el intestino (Kuziemko G. M. et al. (1996) Biochem. 35:6375-6384; Pritchett T. J. et al. (1987) Virology 160:502-506; Spangler B. D. (1992) Microbiol. Rev. 56:622-647).

Aunque numerosos obstáculos hacen que la inmunización oral usando antígenos de subunidad sea un desafío significativo, muchos considera que es un forma muy deseable de vacunación (Barackman J. D. et al. (1998) STP Pharma. Sci. 8:41-46; Challacombe S. J. et al. (1992) Immunol. 76:164-168; Dickinson B. L. y J. D. Clements. "Uso de enterotoxinas termolábiles de *Escherichia coli* como un adyuvante oral" en MUCOSAL VACCINES, Kiyono H. et al. (Eds) Academic Press, Nueva York, 1996, páginas 73-87). Se ha postulado el potencial de vacunación oral para generar fuerte inmunidad celular, mejorarla protección cruzada, memoria y respuestas de IgA secretora (Takase H. et al. (1996) Vaccine 14:1651-1656; Benedetti R. et al. (1998) Res. Immunol. 149:107-118; Gallichan W. S. y K. L. Rosenthal (1996) J. Exp. Med. 184:1879-1890; Meitin C. A. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11187-11191; Ogra P. L. "Inmunoprofilaxis mucosal: un resumen introductorio" en MUCOSAL VACCINES Kiyono H. et al. (Eds) Academic Press, Nueva York, 1996, páginas 3-14), aunque el beneficio añadido de la comodidad del paciente no puede enfatizarse demasiado (Rahman S. et al. (1993) Am. J. Trop. Med. Hyg. 48:823-826).

La administración de una vacuna de influenza en forma de una pastilla masticable o una formulación líquida dulce sabrosa es considerada por muchos la forma preferente de administración en niños, y es más seguro que las formas inyectables para el médico clínico. Se han investigado muchas técnicas para desarrollar vacunas de influenza viables oralmente activas incluyendo la formulación de antígenos de influenza en micropartículas,

acoplado antígenos a proteínas transportadoras que dirigen la absorción celular a placas de Peyer, la expresión de antígenos de influenza en vectores bacterianos y virales y la co-administración con adyuvantes mucosamente activos (Barackman J. D. et al. (1998) STP Pharma. Sci. 8:41-46; Meitin C. A. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:111187-111191; Harokopakis E. et al (1998) Infect. Immun. 66:4299-4304; Neutra M. R. y J. Kraekenbuhl. "Absorción de antígeno por células M para vacunas mucosales efectivas" en MUCOSAL VACCINES Kiyono H. et al., Eds). Academic Press, Nueva York, 1996, páginas 41-55). De esta técnicas, los adyuvantes mucosales, principalmente enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (TL) y toxina de cólera (TC) son las más comúnmente empleadas (Dickinson B. L. y J. D. Clemens "Uso de enterotoxinas termolábiles de *Escherichia coli* como un adyuvante oral" en MUCOSAL VACCINES Kiyono H. et al. (Eds.) Academic Press, Nueva York, 1996, páginas 73-87; Elson C. O. "Toxina de cólera como un adyuvante mucosal" en MUCOSAL VACCINES Kiyono H. et al. (Eds.) Academic Press, Nueva York, 1996, páginas 59-72). Aunque son potentes adyuvantes mucosales, TL y TC son tóxicas en humanos en dosis útiles para adyuvancia, y por lo tanto, no son útiles para desarrollar vacunas orales para influenza.

La subunidad B no tóxica de TC (TCB) se ha investigado como una alternativa a TC entera. Sin embargo, estudios han indicado que se necesitan cantidades pequeñas de TC entera para una potencia suficiente de adyuvante, inhibiendo el potencial de TCB en humanos (Tamura S. et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21:1337-1344; Tamura S. et al. (1992) J. Immunol. 149:981-988; Tamura S. et al. (1994) Vaccine 12:1083-1089). Debido a estos estudios, la actividad de ADP-ribosiltransferasa de TL y TC ha estado implicado como un componente necesario para adyuvancia (Lyche N. et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:2277-81).

Hay una necesidad en la técnica de desarrollar composiciones que provoquen de manera segura una reacción inmune cuando se administran oralmente.

## Resumen de la invención

La presente invención proporciona composiciones que provocan una respuesta inmune en un mamífero donde las composiciones contienen hemaglutinina de virus de influenza y un mutante de LT-K63 o LT-R72 de toxina termolábil de *E. coli* en un transportador farmacéuticamente aceptable para uso oral, como se define en la reivindicaciones.

Se proporciona una composición inmunogénica oral de influenza para mamíferos en la que la composición inmunogénica contiene una cantidad efectiva de una hemaglutinina de influenza y enterotoxina de *Escherichia coli* termolábil LT-K63 o LT-R72.

## Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra una comparación de dosis de enterotoxina en respuestas de anticuerpo de suero específico de antígeno después de administración intragástrica (i.g).

La Fig. 2 muestra una comparación de dosis de enterotoxina en respuestas a IgA de lavado de saliva (LS) específica de antígeno después de administración i.g.

La Fig. 3 muestra una comparación de dosis de HA en respuestas a anticuerpo de suero específica de antígeno después de administración i.g.

La Fig. 4 muestra una comparación de dosis de HA en respuesta a IgA de lavado de saliva (LS) específica de antígeno después de administración i.g.

La Fig. 5 muestra una comparación de los efectos de administración i.m e i.g de HA A/Johannesburg/97 en repuestas a anticuerpo de suero específico de antígeno.

La Fig. 6 muestra una comparación de los efectos de administración i.m e i.g de HA A/Johannesburg/97 en títulos de suero HI de suero.

La Fig. 7 muestra una comparación de los efectos de administración i.m e i.g de HA A/Johannesburg/97 en repuestas de anticuerpo de IgA de lavado nasal (LN) específico de antígeno.

## Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto que los antígenos que no tienen ninguna propiedad de enlace mucoadhesivo o asociada con el intestino tienen mínima inmunogenicidad cuando se administran oralmente en ratones, además de niveles muy altos de dosis, bien en ausencia de LTs o como mezclas de antígeno soluble con LT soluble. Las respuestas inmunes más modestas pueden mostrarse cuando los antígenos de influenza se administran oralmente a niveles razonables de dosis, pero estos antígenos dan como resultado respuesta inmunes sustanciales y amplias cuando se adyuvantan con LT de tipo salvaje o CT (Katz J. M. et al. (1997) J. Infect. Dis. 175:352-363).

Hemos estudiado las toxinas mutantes LT LT-K63 y LT-R72 (Barackman J. D. et al. (1999) Infect. Immun. 67:4276-4279). Estas toxinas demuestran adyuvanticidad similar a la de LT de tipo salvaje cuando se administra intranasalmente en combinación con antígenos de influenza, mientras demuestran una toxicidad *in vitro* e *in vivo* sustancialmente reducida a cero, mejorando las probabilidades de desarrollar una vacuna de influenza ampliamente aplicable, intranasal y efectiva (Barackman J. D. et al. (1999) Infect. Immun. 67:4276-4279; Giuliani M. M et al. (1998) J. Exp. Med. 187:1123-1132). Además, LT-R72 muestra niveles extremadamente bajos de actividad ADP-ribosiltransferasa mientras mantiene una potente actividad adyuvante mucosal, mientras la actividad ADP-ribosiltransferasa es indetectable en LT-K63 a pesar de la adyuvanticidad potente (Giuliani M. M. et al. (1998) J. Exp. Med. 187:1123-1132). Los datos demuestran que la actividad ADP-ribosiltransferasa puede no estar unida a la actividad adyuvante, haciendo que estos adyuvantes sean adyuvantes mucosales no tóxicos adecuados para administración oral en humanos (Freitag L. C. y J. D. Clemens (1999) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 236:215-236).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la práctica de la técnica. Tales técnicas se explican con más detalle en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH, Vols. I y II (D. Glover, ed.); METHODS IN ENZYMOLOGY (S. Colowick y N. Kaplan eds. Academic Press, Inc.); HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications) y FUNDAMENTAL VIROLOGY, 2ª Edición, Vols. I y II (B. N. Field y D. M. Knipe, eds.).

Como aquí se usan, los términos “uno”, “una”, “el” y “la” se refieren al singular y al plural.

Como aquí se usa “mucoadhesivo” se refiere a un compuesto inmunogénico que se encuentra asociado con un agente infeccioso de la mucosa y/o canal alimentario en el que el antígeno tiene propiedades asociadas con el intestino o de enlace mucosal.

Como aquí se usa “mucosa” se refiere al revestimiento interior lubricado de la boca, conductos nasales, vagina y uretra y “canal alimentario” se refiere al tracto digestivo que se extiende de la boca al ano.

Se administra una cantidad efectiva de la composición de la invención a un mamífero con el fin de prevenir o mejorar una infección con un agente infeccioso. Como aquí se usa, la expresión “cantidad efectiva” en referencia al tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o condición, significa una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento y mejorar y/o eliminar la enfermedad o condición, o para prevenir una infección con un agente infeccioso, sin efectos adversos tales como toxicidad, irritación o una respuesta alérgica. Aunque las necesidades individuales pueden variar y serán necesarias algunas variaciones del requisito de dosis para diferentes tipos de mamíferos para conseguir rangos óptimos de cantidades efectivas de formulación, tal experimentación rutinaria está dentro del alcance del artesano experimentado. Las dosis humanas pueden extrapolarse fácilmente de estudios con animales como lo muestra Katocs et al., Capítulo 27 de REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª Edición, Gennaro (Ed.) Mack Publishing Co., Easton, PA. 1990. Generalmente, la dosis requerida para proporcionar una cantidad efectiva de una formulación, que un experto en la técnica puede ajustar, variará dependiendo de varios factores, incluyendo la edad, salud, condición física, peso, tipo y alcance de la enfermedad o trastorno del receptor, frecuencia de tratamiento, la naturaleza de terapia simultánea, si se necesita, y la naturaleza y alcance de los efectos deseado (Nies et al., Capítulo 3, GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 9ª Ed. Hardman et al., Eds. McGraw-Hill, Nueva York NY, 1996). Se contempla una dosis en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 µg.

También se contempla que pueda requerirse más de una administración de la composición. El tiempo entre administraciones depende del número de administraciones que se darán. Por ejemplo, si se dan dos administraciones, la primera puede ocurrir en el mes cero y la segunda puede ocurrir en los meses uno, dos o seis; si se dan cuatro administraciones, pueden ocurrir los meses 0, 1, 2 y 6, respectivamente. Alternativamente, las administraciones pueden ocurrir en intervalo mensuales. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente el tiempo entre administraciones múltiples.

Como aquí se usa, el término “administrar” incluye, aunque no se limita a, administración transdérmica, parenteral, subcutánea, intramuscular y tópica. En el método de la presente invención, al menos una administración es oral, y la ruta preferente de administración es oral. Las composiciones de la presente invención están preferentemente formuladas para administración oral.

El fin planeado de los métodos de la invención desvelada es la mejora de infección con virus de influenza. La mejora puede determinarse, por ejemplo, mediante una disminución en signos y síntomas de la infección asociados con influenza. La inmunización efectiva contra influenza puede controlarse mediante una prueba de suero donde se obtienen anticuerpos específicos de antígeno. En tales pruebas, pueden detectarse anticuerpos en la sangre, saliva y secreción nasal del sujeto usando pruebas rutinarias. Preferentemente, el tratamiento de acuerdo con la invención dará como resultado la aparición de anticuerpos anti-influenza específicos de antígeno, con la

concurrente disminución /desaparición del virus de influenza. En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición inmunogénica puede prevenir la infección con virus de influenza. En algunas realizaciones de la invención, los ensayos pueden detectar la presencia de anticuerpos IgA específicos de antígeno.

5 Los ensayos de suero aquí descritos pueden usarse para ayudar a determinar dosis efectivas para los sujetos. La suficiente estimulación de repuestas inmunes puede determinarse a través de un ensayo inmunológico, tal como Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) o cualquier otro ensayo para detectar anticuerpos específicos de antígeno en fluidos corporales tales como suero, saliva y secreciones nasales. La correlación de la concentración de antígeno en las composiciones de la invención con títulos de anticuerpo proporciona un índice de eficacia en la habilidad de la composición para obtener una respuesta inmune efectiva.

10 Como aquí se usa, la expresión "cantidad inmunológicamente efectiva" en referencia a composiciones inmunogénicas, significa una cantidad suficiente para inducir una repuesta inmune terapéutica o profiláctica.

15 Como aquí se usa, la expresión "repuesta inmune profiláctica" en referencia al tratamiento de un individuo contra la infección por un agente infeccioso, significa una respuesta inmune que es profiláctica y que inhibe el agente infeccioso después del desafío.

20 Como aquí se usa, "inhibe" en referencia a una repuesta inmune profiláctica, significa reducir o eliminar la infección con el agente infeccioso de tal manera que los efectos de la infección se minimicen o eliminen.

Como aquí se usa, la expresión "respuesta inmune terapéutica" en referencia al tratamiento de un individuo afectado con un agente infeccioso, significa una respuesta inmune que mejora y/o elimina el agente infeccioso.

25 Como aquí se usa, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" en referencia a la cantidad de una composición inmunogénica administrada a un individuo, significa una cantidad suficiente para inducir una repuesta inmune terapéutica en el individuo.

30 Como aquí se usa, la expresión "cantidad profilácticamente efectiva" en referencia a la cantidad de una composición inmunogénica administrada a un individuo, significa una cantidad suficiente para inducir una repuesta inmune profiláctica en el individuo.

Como aquí se usa, "individuo" se refiere a animales humanos o no humanos que pueden tratarse con las composiciones inmunogénicas de la invención.

35 "Agentes infecciosos de la mucosa o canal alimentario" incluyen, aunque no se limitan a virus, bacterias, protozoos, hongos y helmintos. La invención se refiere a virus de influenza.

40 El antígeno de hemaglutinina de influenza mucoadhesivo de la presente invención puede prepararse a través de cualquier medio conocido en la técnica. Los patógenos enteros pueden inactivarse, eliminarse, someterse a ultrasonido y/o solubilizarse, por ejemplo, y los antígenos extraerse. Las preparaciones de antígeno para su uso en la invención pueden además purificarse usando métodos convencionales. Alternativamente, los antígenos pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante donde una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno seleccionado se inserta en un vector de expresión que posteriormente se introduce en una célula huésped. Se efectúa la expresión de la proteína recombinante y el antígeno seleccionado se purifica de las células huéspedes mediante métodos convencionales. Tales métodos pueden incluir purificación por afinidad, cromatografía y electroforesis, por ejemplo.

50 La forma de las composiciones orales de la invención puede ser cápsulas, comprimidos, líquidos, jarabes, suspensiones o cualquier otra formulación de administración oral conocida en la técnica. Además, las composiciones orales de la invención pueden combinarse con otros excipientes conocidos y usados en la técnica. Las composiciones pueden tener la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. LT-K63 y LT-R72 pueden usarse en una dosis total de aproximadamente 10 µg a 10 mg. El adyuvante puede formar una parte de una formulación oral total de aproximadamente 0,01 a 1% de la formulación total. La dosis de los excipientes, incluyendo el mucoadhesivo, puede ser de 100 a 1000 veces más que la dosis del adyuvante. La cantidad de antígeno mucoadhesivo en una composición terapéuticamente útil es aquella que es suficiente para obtener una repuesta inmune terapéuticamente efectiva o una repuesta inmune que inhibe la infección.

60 Los comprimidos, trociscos, pastillas, cápsulas y similares también pueden contener los siguientes ingredientes: un aglutinante tal como polivinilpirrolidona, goma tragacanto, acacia, sacarosa, almidón de maíz, gelatina y similares; un excipiente tal como fosfato de calcio, citrato de sodio, carbonato de calcio y similares; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, almidón de tapioca, ciertos silicatos complejos, ácido alginico, y similares; un lubricante tal como lauril sulfato de sodio, talco, estearato de magnesio y similares; un agente endulzante tal como sacarosa, lactosa, sacarina y similares; o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria, esencia de cereza o cualquier otro aromatizante conocido y usado en la técnica. Las composiciones

65

sólidas de un tipo similar también se emplean como rellenos en cápsulas de gelatina con relleno sólido y blando. Cuando la forma de unidad de dosis está contenida en una cápsula, la composición puede estar presente en un transportador líquido.

5 Pueden estar presentes varios otros materiales como revestimientos o para modificar de otra manera la forma física de la unidad de dosis. Por ejemplo, los comprimidos, pastillas o cápsulas pueden estar cubiertas por goma laca, azúcar o ambos.

10 Un jarabe o elixir que contiene la composición de la invención, también puede contener un agente endulzante, conservantes (por ejemplo, metilo y propilparabenos), un tinte, un aromatizante, agentes emulsionantes y/o agentes suspensores, y diluyentes (por ejemplo, agua, etanol, glicol de propileno, glicerina y varias combinaciones de los mismos conocidos y usados en la técnica).

15 Las unidades de dosis son preferentemente puras y se producen bajo condiciones de buenas prácticas de fabricación (BPF).

20 En una realización preferente de la invención, una cantidad inmunogénica de al menos un antígeno de hemaglutinina de influenza se combina con una cantidad efectiva de al menos una enterotoxina de *Escherichia coli* mutante termolábil para formar una composición inmunogénica contra virus de influenza. La composición es para administración oral a mamíferos, particularmente humanos, para obtener una respuesta inmune contra influenza. Más específicamente, se obtiene una repuesta inmune específica de IgA contra influenza, y se encuentra anticuerpos IgA anti-influenza en la saliva y secreciones nasales del mamífero que recibe la composición inmunogénica. La enterotoxina usada en las composiciones es LT-K63, LT-R72 o mezclas de las mismas. La administración de la composición inmunogénica es por medio de la ruta oral.

25

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

30 1.1.1 Antígenos de influenza usados

Antígenos de influenza de virus de segunda generación A/Beijing8-9/93 (H3N2) y A/Johannesburg/97 (H1N1) monovalentes purificados proporcionados por Chiron Vaccines, Siena, Italia. La dosificación se basó en contenido de HA como se ensayó con inmunodifusión radial simple (IDRS) como se ha descrito previamente (Johannsen R. et al. (1985) Vaccine 3:235-240). Se prepararon LT-K63 y LT-R72 como se ha descrito previamente (Pizza M. et al. (1994) Mol. Microbiol. 14:51-60). TL de tipo salvaje (wtLT) obtenida de Sigma (enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, polvo liofilizado, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Todas las preparaciones inmunogénicas se formularon en tampón fosfato salino (PBS). Los inmunogenes preparados para administración i.g incluyeron 1,5% p:v de bicarbonato sódico.

40 1.2.1 Inmunización y recogida de muestra

45 Grupos de 10 ratones hembra Balb/c (Charles River Labs, Wilmington, MA), de 6 a 10 semanas de edad, se inmunizaron de acuerdo con la Tablas 1, 2 y 3. Los ratones ayunaron 12 horas antes de cada inmunización. Las inmunizaciones se hicieron mediante inyección i.m (50 µl) en el músculo del muslo posterior, o i.g directa en el estómago (200 µl) usando una aguja de alimentación de acero inoxidable de calibre 20 unida a una jeringa de 1 ml. Los animales no fueron anestesiados durante la inmunización. La recogida de muestra de sangre se realizó mediante pinchazo del seno orbital usando un tubo para microhematocrito después de una anestesia ligera usando gas de isofluorano. El suero se separó de la sangre usando métodos estándares. Las muestras de lavado de saliva (LS) se recogieron colocando un extremo de una mecha adsorbente de celulosa de 0,2 x 3,2 cm (Amercia Filtrona, Richmond, VA) en la boca de cada ratón anestesiado de uno a dos minutos para adsorber saliva. Después los anticuerpos se eluyeron en PBS (400 µl) antes del ensayo. Las muestras de lavado nasal (LN) se recogieron anestesiando primero a los animales con una mezcla de hidrocloreuro de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (4 mg/kg). Se insertó PBS (600 µl) en la cavidad nasal usando un catéter conectado a una jeringa pequeña mientras el animal se mantenía en una posición recostada dorsal con la cabeza ligeramente inclinada hacia abajo. Los lavados se recogieron mediante flujo de gravedad en tubos pequeños. El suero y las muestras secretoras se almacenaron congelados (-70 °C) hasta someterse a ensayo.

55

1.2.2 Efecto de tipo y dosis de enterotoxina en respuestas a anticuerpo después de inmunización i.g

60 Se realizó un estudio de rango de dosis para determinar la relación de respuesta a dosis para LT-K63 y LT-R72 para inmunización i.g con A/Beijing8-9/93 HA. Se inmunizaron grupos de 10 ratones mediante ruta i.g con 20 µg de A/Beijing8-9/93 HA en combinación con tres niveles de dosis de wtLT, LT-K63 y LT-R72 como se describe en la Tabla 1. Se incluyeron grupos que recibieron A/Beijing8-9/93 HA adyuvantado con wtLT, y un grupo que recibió A/Beijing8-9/93 HA no adyuvantado (solamente HA) para fines comparativos.

65

**TABLA 1. Rango de dosis de adyuvantes**

Grupo	Amt (mg) de			Programa de inmunización (días)	Ruta	Día de recogida de muestra
	HA	Enterotoxina	Tipo de enterotoxina			
1	20	Ninguna	-	0. 21. 35	i.g	49
2	20	1	wtLT	0. 21. 35	i.g	49
3	20	10	wtLT	0. 21. 35	i.g	49
4	20	25	wtLT	0. 21. 35	i.g	49
5	20	1	LT-K63	0. 21. 35	i.g	49
6	20	10	LT-K63	0. 21. 35	i.g	49
7	20	100	LT-K63	0. 21. 35	i.g	49
8	20	1	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49
9	20	10	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49
10	20	100	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49

Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2

1.2.3 Efecto de dosis de A/Beijing8-9/93 HA en respuestas a anticuerpo en dos niveles de dosis de LT-R72.

Se realizó un segundo estudio de rango de dosis para determinar la dosis óptima de A/Beijing8-9/93 HA para inmunización i.g cuando se adyuvantó con LT-R72. Se inmunizaron grupos de 10 ratones mediante ruta i.g con tres niveles de dosis de A/Beijing8-9/93 HA en combinación con 10 µg o 100 µg LT-R72 como se describe en la Tabla 2. Se incluyó un grupo de control A/Beijing8-9/93 HA no adyuvantado (solamente HA) para fines comparativos.

**TABLA 2. Rango de dosis de adyuvante con LT-R72**

Grupo	Amt (mg) de			Programa de inmunización (días)	Ruta	Día de recogida de muestra
	HA	Enterotoxina	Tipo de enterotoxina			
11	20	Ninguna	-	0. 21. 35	i.g	49
12	1	10	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49
13	5	10	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49
14	20	10	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49
15	1	100	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49
16	5	100	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49
17	20	100	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49

Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4.

1.2.4 Comparación de inmunización i.g e i.m

Las respuestas de anticuerpo de suero de ratones inmunizados i.g con A/Johannesburg/97 HA solo o en combinación con una TL se compararon con ratones inmunizados con A/Johannesburg/97 HA mediante la ruta i.m. Se inmunizaron grupos de 10 ratones mediante la ruta i.g con 20 µg A/Johannesburg/97 HA solo, o en combinación con dos niveles de dosis de wtLT, LT-K63 o LT-R72 como se describe en la Tabla 3. Se incluyó un grupo que recibió 1 µg A/Johannesburg/97 HA mediante la ruta i.m para fines comparativos.

TABLA 3. Comparación de inmunización intragástrica contra intramuscular

Grupo	Amt (mg) de			Programa de	Ruta	Día de recogida
	HA	Enterotoxina	Tipo de enterotoxina	inmunización (días)		de muestra
18	20	Ninguna	-	0. 21. 35	i.g	49
19	20	1	wtLT	0. 21. 35	i.g	49
20	20	10	wtLT	0. 21. 35	i.g	49
21	20	10	LT-K63	0. 21. 35	i.g	49
22	20	100	LT-K63	0. 21. 35	i.g	49
23	20	10	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49
24	20	100	LT-R72	0. 21. 35	i.g	49
25	1	Ninguna	-	0. 21. 35	i.g	49

Los resultados se muestran en las Figuras 5, 6 y 7.

### 1.3.1 ELISA de anticuerpo

Las muestras de suero de animales individuales se sometieron a ensayo para títulos totales Ig anti-HA (IgG más IgA más IgM) mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima colorimétrico con base de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (ELISA) como se ha descrito previamente con A/Beijing8-9/93 o A/Johannesburg/97 como sea apropiado como antígeno de revestimiento (Harlow E. y D. Lane "Immunoassay" en ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL. Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York, 1988, páginas 553-618).  $A_{490}$  se midió usando un lector estándar de ELISA. Los títulos representan diluciones recíprocas de suero dando un  $A_{490}$  de 0,5 y se normalizaron a un estándar de suero analizado en paralelo. Las muestras SW y NW de animales individuales se analizaron para títulos IgA específicos de HA usando un ensayo inmunoabsorbente de bioluminiscencia como se ha descrito previamente con A/Beijing8-9/93 o A/Johannesburg/97 como sea apropiado como antígeno de revestimiento (Ugozzoli M. et al (1998) Immunol. 93:563-571). El conjugado de biotina IgA anti-ratón de cabra (EY Labs, San Mateo, CA) usado fue pre-saturado con IgG de ratón purificado (1 mg/ml, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) para reducir la reactividad cruzada. La cuantificación se basó en el número de unidades de luz relativas que representan la luminiscencia total integrada en 3 s (unidades arbitrarias). Los títulos representan valores de dilución de logaritmo linealmente extrapolados del logaritmo de las unidades de luz relativas hasta un valor límite al menos dos desviaciones estándares por encima de la referencia media.

### 1.3.2 Respuestas a anticuerpo de suero después de administración i.g

Las respuestas a anticuerpo de suero (Fig. 1) fueron significativamente mayores en la mayoría de los casos en animales que recibieron A/Beijing8-9/93 HA en combinación con las enterotoxinas analizadas en comparación con los animales que recibieron A/Beijing8-9/93 HA no adyuvantado. La Figura 1 muestra títulos medios de anticuerpo de anti-A/Beijing8-9/93 HA en el suero de ratones inmunizados con dosis de 20  $\mu$ g de un antígeno A/Beijing8-9/93 bien solo (solamente HA) o en combinación con enterotoxinas como se muestra en la Tabla 1. Los asteriscos indican grupos cuyos valores son significativamente mayores que los del grupo con HA solamente ( $P \leq 0,05$ ). No se demostró una respuesta a la dosis de manera clara, aunque los grupos que recibieron A/Beijing8-9/93 HA en combinación con 10  $\mu$ g y 100  $\mu$ g de LT-R72 resultaron ser comparables a las respuestas de grupos que recibieron A/Beijing8-9/93 HA en combinación con wtLT. Solamente un grupo (grupo 7 en un nivel de dosis de 100  $\mu$ g LT-K63) no demostró un efecto adyuvante fuerte.

Se encontró una respuesta más clara de dosis de adyuvante en las respuestas de IgA de saliva específicas de antígeno (Fig. 2). La Figura 2 muestra títulos medios de anticuerpo IgA de anti-A/Beijing8-9/93 HA SW de grupos de ratones inmunizados con dosis de 20  $\mu$ g de antígeno A/Beijing8-9/93 HA solo (HA solamente) o en combinación con enterotoxinas como se muestra en la Tabla 2. Los asteriscos indican grupos cuyos valores son significativamente mayores que los del grupo de HA solamente ( $P \leq 0,05$ ). Se demostraron respuestas de IgA de saliva significativamente más fuertes para todos excepto para uno de los grupos adyuvantados LT-K63 y LT-R72 en comparación con animales que recibieron A/Beijing8-9/93 HA solo. Además, los animales a los que se les administró

una dosis i.g con 20 µg A/Beijing8-9/93 HA en combinación con 100 µg de LT-R72 resultaron tener una repuesta de IgA de saliva específica de antígeno significativamente más alta ( $P \leq 0,05$ ) que los animales a los que se les administró una dosis i.g con 10 µg o 25 µg de wtLT.

5 1.3.3 Comparación de dosis enterotóxica en respuestas de IgA SW específicas de antígeno después de administración i.g.

10 Las respuestas a anticuerpo de suero específico de antígeno (Fig. 3) demostraron una tendencia de respuesta a dosis con respecto al nivel de dosis de A/Beijing8-9/93 HA y el nivel de dosis de LT-R72 con el que los animales fueron inmunizados. La Figura 3 muestra títulos medios de anticuerpo anti- A/Beijing8-9/93 HA en el suero de ratones inmunizados con dosis de 1, 5 o 20 µg de A/Beijing8-9/93 HA en combinación con 10 µg o 100 µg de LT-R72 en comparación con 20 µg HA administrados solos (HA solamente) como se muestra en la Tabla 2. Los asteriscos indican grupos cuyos valores son significativamente diferentes a los del grupo de HA solamente ( $P \leq 0,05$ ). Las respuestas de anticuerpo de suero fueron significativamente mayores ( $P \leq 0,05$ ) en animales inmunizados con dosis de 20 µg de A/Beijing8-9/93 HA en combinación con 10 µg o 100 µg de LT-R72 en comparación con el grupo de control no adyuvantado. El grupo que recibió el nivel más alto de dosis analizado (20 µg A/Beijing8-9/93 HA en combinación con 100 µg de LT-R72) tuvo una respuesta a anticuerpo de suero específico de antígeno significativamente mayor ( $P \leq 0,05$ ) que el resto de grupos analizados.

20 Las respuestas a IgA de saliva específica de antígeno (Fig. 4) correspondieron a la tendencia vista con las respuestas a anticuerpo de suero con la excepción del grupo que recibió 1 µg de A/Beijing8-9/93 HA en combinación con 10 µg de LT-R72 (grupo 12). La Figura 4 muestra títulos medios de anticuerpo IgA anti-A/Beijing8-9/93 HA SW de grupos de ratones inmunizados con dosis de 1, 5 o 20 µg de A/Beijing8-9/93 HA en combinación con 10 µg o 100 µg de LT-R72 en comparación con 20 µg HA administrados solos (HA solamente) como se muestra en la Tabla 2. Los asteriscos indican grupos cuyos valores son significativamente diferentes a los del grupo de HA solamente ( $P \leq 0,05$ ). Los animales que recibieron 5 µg o 20 µg de A/Beijing8-9/93 HA en combinación con 100 µg de LT-R72 demostraron una respuesta a IgA de saliva específica de antígeno significativamente mayor ( $P \leq 0,05$ ) en comparación con los animales que recibieron A/Beijing8-9/93 HA no adyuvantado.

30 1.3.4 Comparación de los efectos de administración i.m e i.g en respuesta a anticuerpo de suero específico de antígeno

35 Las respuestas a anticuerpo de suero específico de antígeno (Fig.5) fueron equivalentes o mayores para ratones inmunizados i.g con 20 µg de A/Johannesburg/97 HA adyuvantado con una TL en comparación con ratones inmunizados i.m. La Figura 5 muestra títulos medios de anticuerpo anti- A/Johannesburg/97 HA en el suero de ratones inmunizados como se muestra en la Tabal 3. Los asteriscos indican grupos cuyos valores son significativamente diferentes a los del grupo inmunizado i.m ( $P \leq 0,05$ ). Los ratones inmunizados i.g con 20 µg de A/Johannesburg/97 HA no adyuvantado (HA solamente) o en combinación con 10 µg LT-K63 tuvieron significativamente unas respuestas más bajas ( $P \leq 0,05$ ) a anticuerpo de suero específico de antígeno en comparación con ratones inmunizados mediante la ruta i.m, aunque la inmunización i.g en presencia de 10 µg de LT-K63 dio como resultado respuesta a anticuerpo de mayor logaritmo que la inmunización ig. Con A/Johannesburg/97 HA no adyuvantado. Los ratones inmunizados i.g con 20 µg A/Johannesburg/97 HA en combinación con 100 µg de LT-R72 dieron como resultado respuestas a anticuerpo de suero específico de antígeno que fueron significativamente mayores ( $P \leq 0,05$ ) que las encontradas para inmunización i.m.

45 1.3.5 Comparación de los efectos de administración i.m e i.g en repuestas a anticuerpo IgA NW específico de antígeno

50 La Figura 7 muestra una comparación de los efectos de administración i.m e i.g de A/Johannesburg/97 HA en respuestas a anticuerpo de IgA NW específico de antígeno. Se muestran los títulos medios de IgA NW anti-A/Johannesburg/97 HA de ratones inmunizados como se muestra en la Tabla 3. Los asteriscos indican grupos cuyos valores son significativamente mayores a los del grupo inmunizado i.m ( $P \leq 0,05$ ). Las respuestas a IgA NW específico de antígeno resultaron ser significativas solamente en aquellos ratones inmunizados i.g con 20 µg A/Johannesburg/97 HA en combinación con wtLT, LT-K63 o LT-R72. Los ratones inmunizados mediante inmunización i.m o i.g con 20 µ de A/Johannesburg/97 HA solo no dieron como resultado respuestas significativas a IgA NW específico de antígeno.

1.4.1 Ensayo IH

60 El Laboratorio de Enfermedad Viral y de Rickettsia (Departamento de Servicios de Salud, Berkeley, CA) analizó muestras de suero agrupadas por grupo para título de inhibición de hemaglutinina (HA) usando un ELISA estándar. El ensayo IH se basa en la habilidad del suero de muestra para inhibir la aglutinación de eritrocitos de cabra en presencia de antígeno de HA. Los títulos resultantes se expresan como la dilución recíproca requerida para la completa inhibición (Hierholzer J. C y M. T. Suggs (1969) Appl. Microbiol. 18:816-823; Hierholzer J. C. et al. (1969) Appl. Microbiol. 18:824-33).

## 1.4.2 Comparación de los efectos de administración i.m e i.g en títulos IH de suero

5 La Figura 6 muestra una comparación de los efectos de administración i.m e i.g de A/Johannesburg/97 HA en títulos IH de suero. Los datos mostrados son para suero agrupado de grupos de ratones inmunizados como se muestra en la Tabla 3. Los títulos IH de suero para ratones inmunizados i.m con 20 µg de A/Johannesburg/97 HA en combinación con 10 µg de wtLT o 100 µg de LT-R72 fueron comparables en potencia a ratones inmunizados i.m. Los ratones que fueron inmunizados i.g con 20 µg de A/Johannesburg/97 HA en combinación con 1 µg de wtLT, 10 µg de LT-R72 o 100 µg de LT-K63 dieron como resultado niveles modestos de título de IH. No se demostraron títulos significativos de IH para ratones inmunizados i.g con 20 µg de A/Johannesburg/97 HA solo, o en combinación con 10 µg de LT-K63.

## 1.5.1 Estadísticas

15 Los títulos IgA de Ig de suero, IgA de saliva y nasales de logaritmo anti-A/Beijing8-9/93 y anti-A/Johannesburg/97 HA de animales individuales se analizaron usando un procedimiento de diferencia significativa mínima de Fisher (Andrews H. P. et al. (1980) Am. Statistician 34:195-199). Se presentaron intervalos de comparación de manera que barras no superpuestas implican una significancia estadística entre promedios de más de 5% ( $P \leq 0,05$ ).

20 Los experimentos anteriores demuestran que los títulos potentes de anticuerpo de suero específico de antígeno y los títulos neutralizadores virales (como lo indican los títulos de IH) son comparables o más fuertes que las respuestas a IgA i.m cuando se inducen en ratones con antígeno de HA de influenza usando inmunización i.g y adyuvantado con TLs mutantes que demuestran niveles significativamente reducidos (LT-R72) y no medibles (LT-K63) de actividad de ADP-ribosiltransferasa (Giulani M.M et al. (1998) J. Exp. Med. 187:1123-1132).

25 Los ejemplos anteriores son ilustrativos de la invención, pero no pretenden limitar el alcance de la invención que está limitada por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende
- 5 (i) una cantidad inmunogénica de un antígeno de hemaglutinina de un virus de influenza y  
(ii) al menos una enterotoxina de *Escherichia coli* mutante termolábil seleccionada del grupo consistente en LT-K63 y  
LT-R72,
- 10 **caracterizada porque** la composición es para administración oral a un mamífero y tiene forma de comprimidos  
ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, jarabes y obleas.
2. La composición de la reivindicación 1 donde LT-K63 o LT-R72 están presentes en una dosis total de entre 10 µg y  
10 mg.
- 15 3. La composición de la reivindicación 2, en forma de comprimidos ingeribles o comprimidos bucales.
4. La composición de cualquier reivindicación precedente, donde el mamífero es un humano.
5. Uso de
- 20 (i) un antígeno de hemaglutinina de un virus de influenza y  
(ii) una enterotoxina de *Escherichia coli* mutante termolábil seleccionada del grupo consistente en LT-K63 y LT-R72,  
en la fabricación de un medicamento para administración oral a un mamífero para obtener una respuesta inmune.
- 25 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5 donde la administración a dicho mamífero obtiene IgA específico de  
antígeno en secreciones nasales o saliva de dicho mamífero.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 5 o reivindicación 6 donde LT-K63 o LT-R72 están presentes en el  
medicamento en una dosis total de 10 µg a 10 mg.
- 30 8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 donde el medicamento tiene forma de  
comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, jarabes u obleas.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 donde el medicamento tiene forma de comprimidos ingeribles o  
comprimidos bucales.
- 35 10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, donde el mamífero es un humano.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en medicina.

FIG. 1

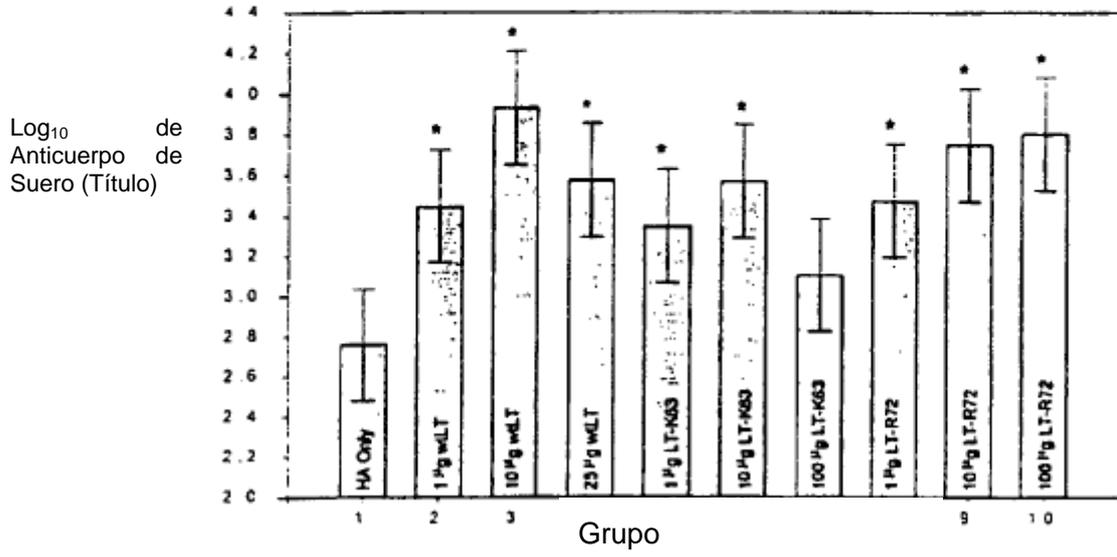
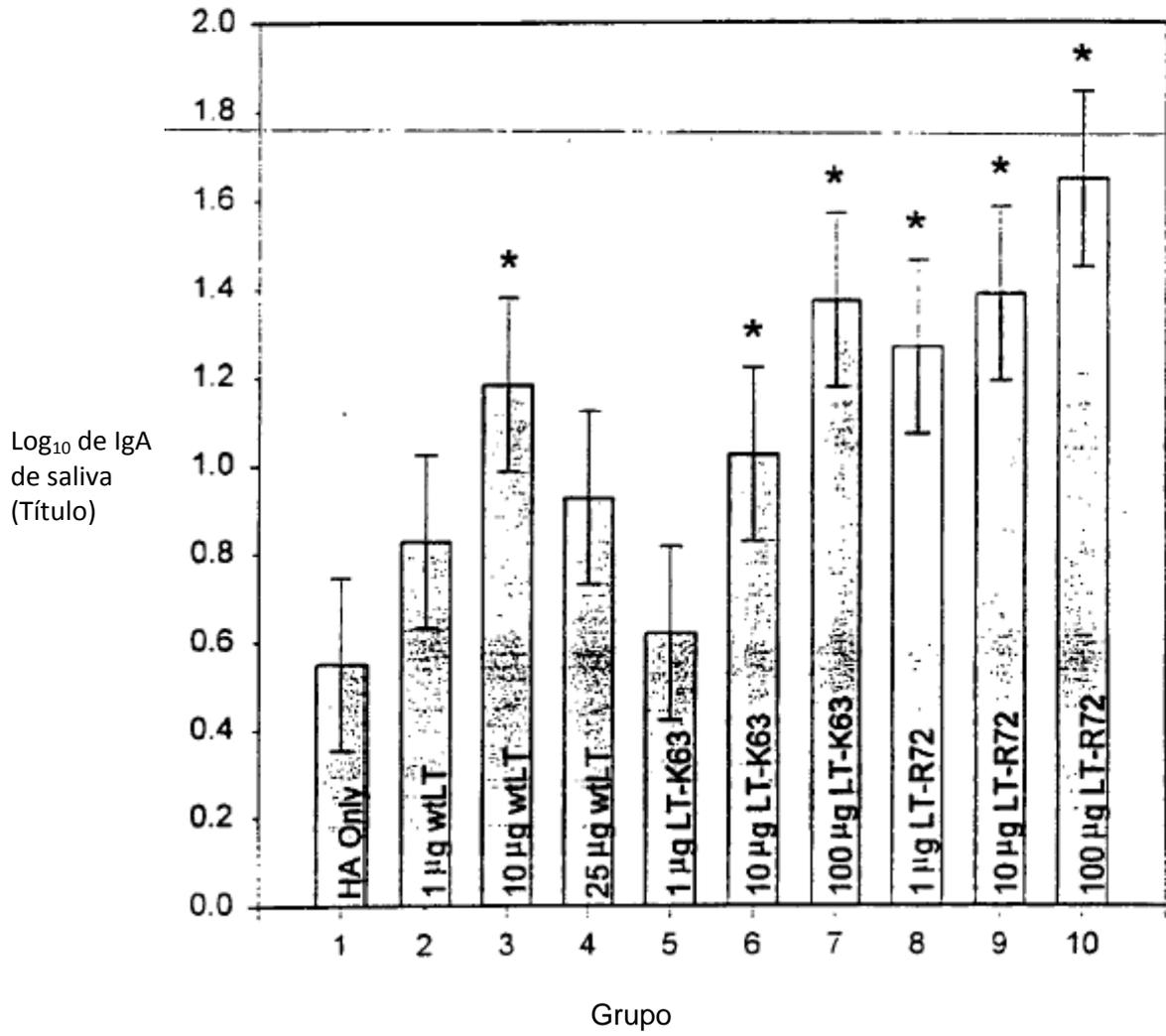


FIG. 2



**FIG. 3**

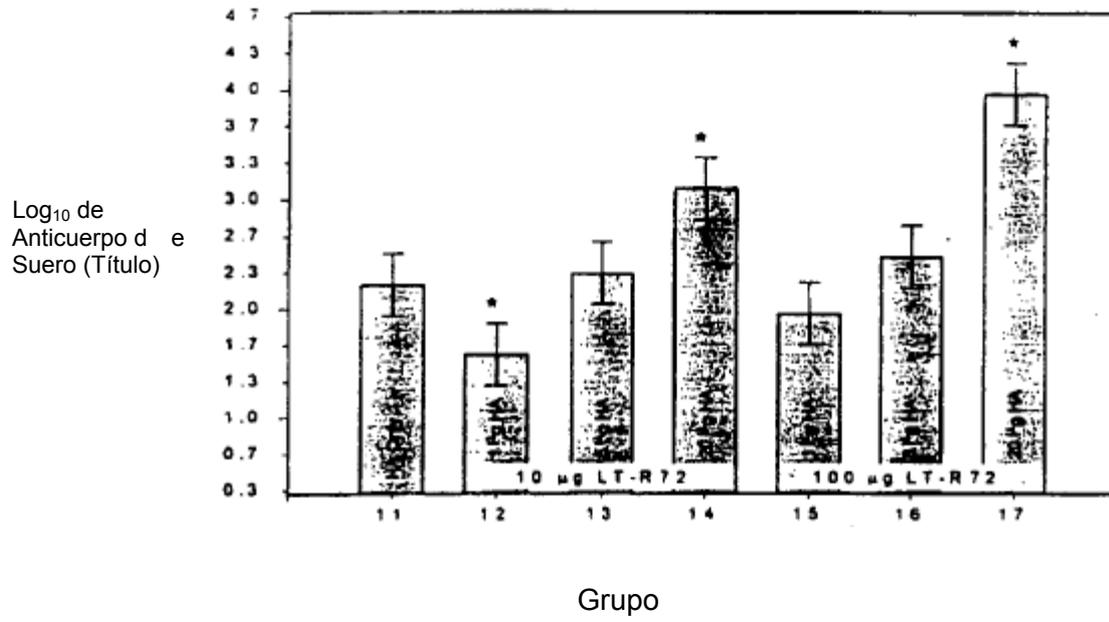


FIG. 4

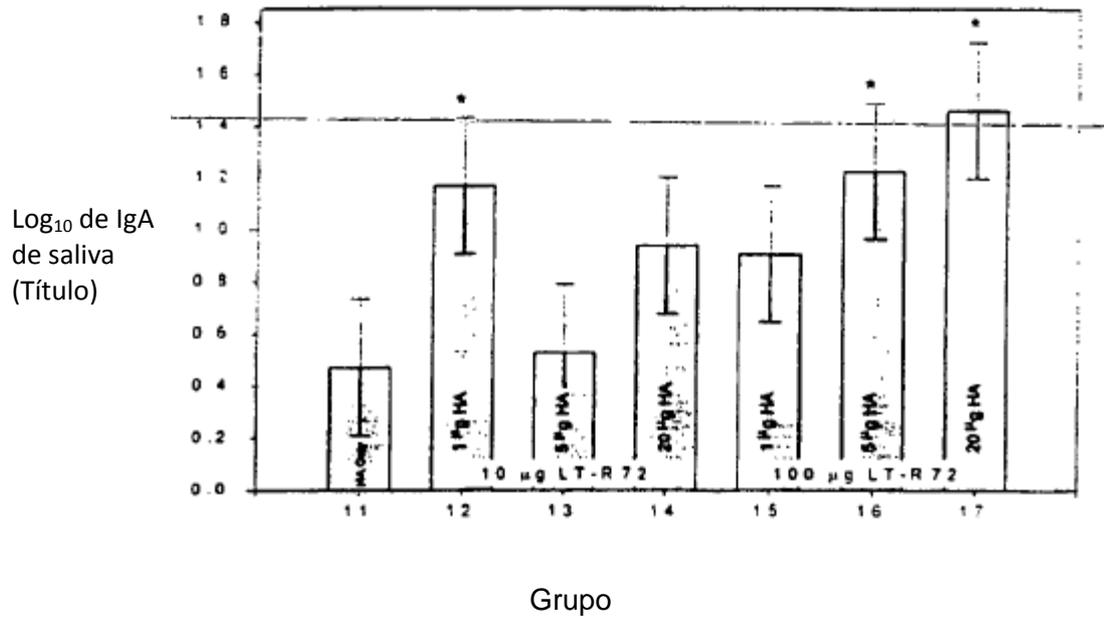


FIG. 5

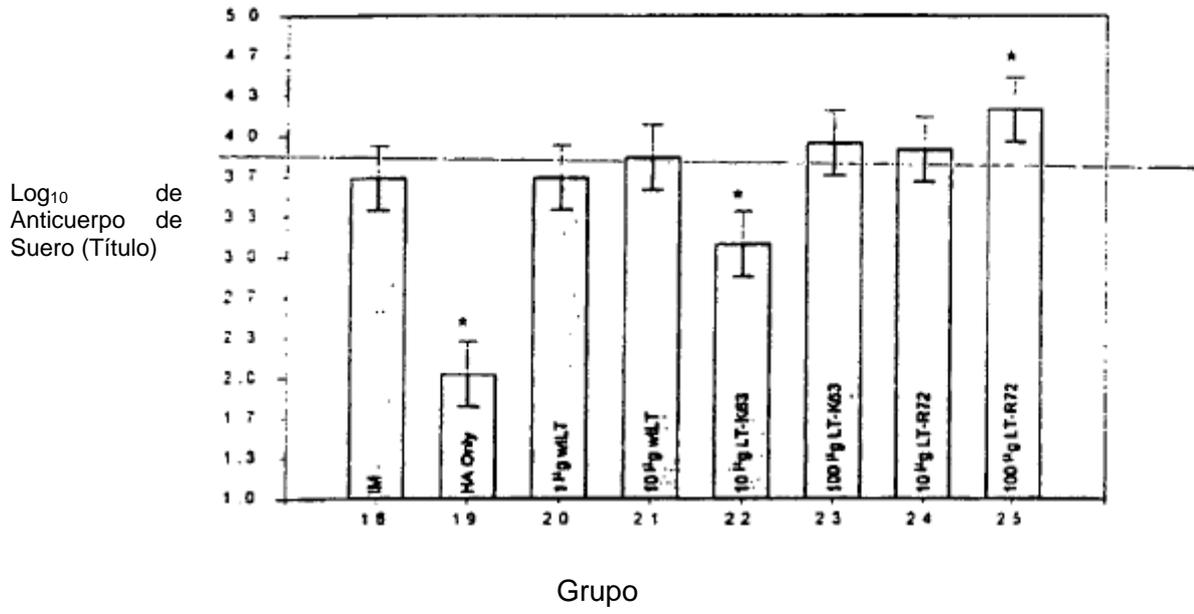
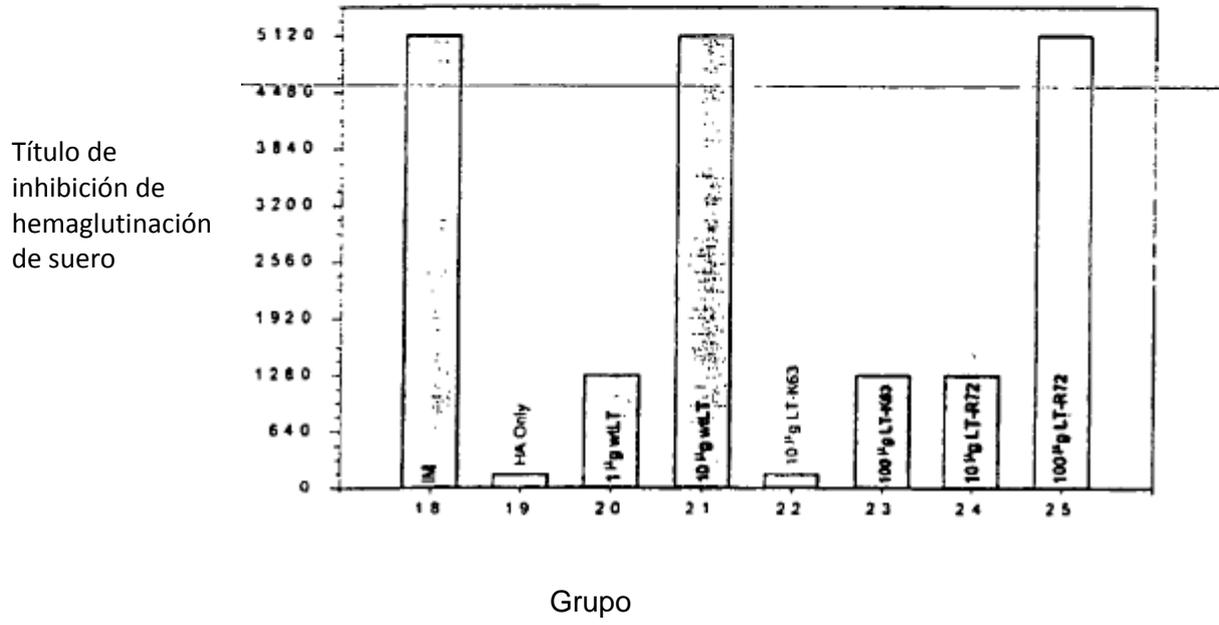


FIG. 6



**FIG. 7**

Log<sub>10</sub> de IgA de lavado nasal (Título)

