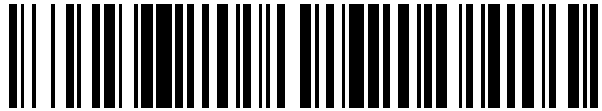


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 242**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2008 E 08751817 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2133092**

54 Título: **Vacuna oral**

30 Prioridad:

19.03.2007 JP 2007070626

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

11.03.2016

73 Titular/es:

**MORISHITA JINTAN CO., LTD. (100.0%)
2-40, TAMATSUKURI 1-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI OSAKA 540-8566, JP**

72 Inventor/es:

**SHIRAKAWA, TOSHIRO;
KAWABATA, MASATO;
TAKATA, TETSUO;
TANIGUCHI, MICHIKO;
OKAMOTO, ASAKO;
ASADA, MASANORI y
NAKATSUJI, MASAOKI**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 563 242 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna oral

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una vacuna oral útil para prevenir y tratar una enfermedad infecciosa bacteriana, y un método para producir la misma.

10 Antecedentes de la técnica

15 La fiebre tifoidea es una de las enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella enterica* var. Typhi, que es un tipo de bacteria de la salmonela; infección causada por la ingestión de agua potable contaminada, comida, o similares. La fiebre tifoidea es común en todo el mundo, en particular, en las zonas de Asia, Oriente Medio, Europa del Este, África y América Central y del Sur. Cada año, 16 millones de personas están afectadas por la fiebre tifoidea, y 0,6 millones de personas mueren de esta enfermedad. La mayoría de los muertos son niños en los países en desarrollo. Actualmente, una bacteria de salmonela atenuada (Ty2la) o similar se administra por vía oral en forma de vacuna contra la fiebre tifoidea causada por la bacteria de salmonela, pero no se puede administrar a los bebés de 5 años o menos, debido a sus efectos secundarios, como diarrea o vómitos. Una vez que una persona se ve afectada por la fiebre tifoidea, un anticuerpo contra la fiebre tifoidea se desarrolla dentro del cuerpo, y la inmunidad se adquiere, pero este efecto no dura mucho tiempo.

25 El cólera es una de las enfermedades infecciosas causadas por *Vibrio cholerae* O1 o O139. El cólera es prevalente en todo el mundo, en particular, en Asia, Oriente Medio y África. Epidemias de cólera clásicas han ocurrido repetidamente y varios millones de personas han muerto de esta enfermedad debido a su fuerte patogenicidad (tasa de mortalidad 20%). Actualmente, la gente se inoculan contra esta enfermedad, pero el efecto de tal inoculación es relativamente bajo y se dice que es aproximadamente del 50%.

30 La disentería bacteriana (shigelosis) es una enfermedad infecciosa bacteriana ampliamente distribuida en todo el mundo, y que se nota sobretodo en países con falta de higiene. Disentería bacteriana es causada por las bacterias intestinales que pertenecen al género *Shigella*, que incluye cuatro grupos que consisten en *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, en orden de patogenicidad.

35 Como se describió anteriormente, hay diversas enfermedades infecciosas bacterianas, y es evidente que las vacunas eficaces contra enfermedades infecciosas bacterianas son necesarias. En particular, las vacunas para la prevención de enfermedades infecciosas de transmisión entre humanos son necesarias. Actualmente, por ejemplo, algunas vacunas contra varias especies de salmonella son comercialmente disponibles. Estas vacunas son a veces eficaces, pero tienen desventajas graves. Estas vacunas normalmente inducen anticuerpos causados por la infección con la bacteria silvestre, y una carga excesiva se coloca en los sujetos.

40 Con el fin de resolver este problema, un estudio se centró en el flagelo de las bacterias también se ha llevado a cabo. Un flagelo es una estructura larga que sobresale de la superficie celular de las bacterias, y juega un papel importante cuando las células muevan e invadan una célula huésped. El flagelo se compone de una proteína conocida como flagelina. Esta proteína flagelina ha sido conocida por inducir un alto nivel de anticuerpos. La flagelina de proteína antigénica de *Salmonella typhimurium* se describe por M. McClelland M. et al. en *Nature*, vol. 413, p. 852 (2001). La flagelina de proteína antigénica de *Vibrio cholerae* se describe por Heiderberg et al. en *Nature*, vol. 406, p. 477 (2000). Además, la flagelina de proteína antigénica de *Shigella dysenteriae* se describe por Tominaga A. et al. en *Genes Genet. Syst.*, Vol. 76, p. 111 (2001). Sin embargo, una vacuna eficaz para el uso de este tipo de anticuerpo contra flagelo no se ha proporcionado aún.

50

Descripción de la invención

55 Es un objeto de la presente invención el de proporcionar medios para utilizar, como vacuna, una proteína de flagelina derivada de una bacteria que provoca una enfermedad infecciosa, debido a que la enfermedad infecciosa no es causada por la proteína de flagelina solo.

La presente invención proporciona una vacuna oral contra una enfermedad infecciosa bacteriana, en la forma de una formulación de cápsula, que comprende:

60 una membrana de la cápsula y un microorganismo transformado que expresa una proteína de antígeno de flagelina, donde la membrana de la cápsula es resistente a los ácidos, y el microorganismo transformado se encapsula con la membrana de la cápsula.

65 La presente invención también proporciona un primer método para producir una vacuna oral frente a una

enfermedad infecciosa bacteriana, que comprende las etapas de:

5 la preparación de un microorganismo transformado que expresa una proteína de antígeno de flagelina; y
la envoltura del microorganismo transformado en una membrana de la cápsula resistente a los ácidos,
produciendo de este modo una formulación de cápsula resistente a los ácidos.

La presente invención proporciona además un segundo método para producir una vacuna oral frente a una
enfermedad infecciosa bacteriana, que comprende las etapas de:

10 la preparación de un microorganismo transformado que expresa una proteína de antígeno de flagelina;
la envoltura del microorganismo transformado en una membrana de la cápsula, produciendo de este modo
una formulación de cápsula; y
15 la proporción de la membrana de la cápsula de la formulación en cápsulas producidas con resistencia a los
ácidos.

En una realización, la proteína de antígeno de flagelina que se expresa en la célula del microorganismo.

En otra realización, la proteína de antígeno de flagelina se secreta de la célula del microorganismo.

20 En una realización, el microorganismo es al menos uno seleccionado de microorganismos pertenecientes al grupo
que consta del género *Bifidobacterium*, el género *Lactobacillus*, al género *Lactococcus*, el género *Pediococcus*, el
género *Streptococcus*, del género *Enterococcus*, el género *Leuconostoc*, el género *Tetragenococcus*, el género
Oenococcus, y el género *Weissella*.

25 En una realización, la vacuna oral es una vacuna contra la fiebre tifoidea, el cólera, o disentería.

En una realización, la formulación en cápsulas es una formulación de cápsula transparente, una formulación de
cápsula blanda, o una formulación de cápsula dura.

30 De acuerdo con la presente invención, un microorganismo transformado que expresa una proteína antigénica de
flagelina está contenida en una formulación de cápsula resistente a los ácidos. Por lo tanto, el microorganismo
transformado está protegido de ácido gástrico con el fin de permitir que sea efectivamente entregado en el intestino
con vida. La formulación se desintegra en el intestino para liberar el microorganismo transformado, que produce la
35 proteína antigénica de flagelina. La flagelina en sí no es infecciosa, sin embargo, un anticuerpo se produce en el
cuerpo. En particular, el microorganismo transformado se puede preparar a partir de bacterias intestinales,
comúnmente conocidas como bacterias buenas, tales como las bifidobacterias o bacterias del ácido láctico, que es
viable en el intestino. En consecuencia, la proteína flagelina se produce en el intestino, y la proteína de flagelina
producida, se considera entonces como un antígeno para inducir la producción de anticuerpos en el cuerpo. Por lo
tanto, la enfermedad infecciosa se puede prevenir.

40 Por consiguiente, la presente invención puede proporcionar un método para la prevención y el tratamiento de
enfermedades infecciosas bacterianas con una pequeña carga de anticuerpo.

Breve descripción de los dibujos

45 La FIG. 1 es una vista esquemática que muestra la estructura del plásmido pBLES 100.
La FIG. 2 es una vista esquemática que muestra la estructura de pBLES-FlIC preparado como un vector de
expresión flagelina.
La FIG. 3 es una vista esquemática en sección transversal que muestra la configuración de una formulación
50 de cápsula transparente de tres capas que contienen un microorganismo transformado de flagelina.

El mejor modo de llevar a cabo la invención

55 Una vacuna oral contra una enfermedad infecciosa bacteriana de acuerdo con la presente invención en la forma de
una formulación de cápsula. En este documento, una cápsula contiene contenido del mismo se conoce como una
"formulación de cápsula". La formulación de cápsula según la presente invención incluye una membrana de la
cápsula y un microorganismo transformado que expresa una proteína de antígeno de flagelina, en la que la
membrana de la cápsula es resistente a los ácidos. La formulación de cápsula incluye una membrana de la cápsula
60 resistente a los ácidos y un microorganismo transformado que expresa una proteína de antígeno de flagelina que
puede tener cualquier configuración y cualquier forma, siempre y cuando esta formulación cápsula tenga una
membrana de la cápsula resistente a los ácidos y contiene un microorganismo transformado que expresa una
proteína de antígeno de flagelina como el contenido de la cápsula, sin excluir la formulación que incluye además un
elemento constituyente adicional. En consecuencia, el microorganismo transformado que expresa la proteína de
antígeno de flagelina se encapsula en o envuelve la membrana de la cápsula resistente al ácido (es decir, contenida
65 dentro de la cápsula formada por la membrana resistente a los ácidos). En este documento, esta formulación de
cápsula también se conoce como una "formulación de cápsula resistente al ácido".

En lo sucesivo, la adquisición de un gen para la flagelina (gen de flagelina), la preparación de un vector para expresar la flagelina (vector de expresión flagelina), la preparación de un microorganismo transformado que expresa la flagelina, y la producción de una formulación de cápsula resistente a los ácidos que contiene el microorganismo transformado para la preparación de una vacuna oral, y una vacuna oral contra una enfermedad infecciosa bacteriana se describirá secuencialmente en las secciones siguientes.

1. Adquisición de Gen de Flagelina

Un gen que codifica la flagelina está disponible basado en secuencias génicas conocidas. Un gen que codifica la flagelina puede ser adquirido, por ejemplo, mediante la realización de la amplificación a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN genómico o ADNc preparados a partir de bacterias patógenas infecciosas (por ejemplo, bacterias que causan salmonella, cólera o disentería) como una plantilla con un par de cebadores preparados sobre la base de la información de la secuencia del gen estructural de la flagelina de la bacteria.

Un gen que codifica la flagelina de fiebre tifoidea está disponible basado en la secuencia del gen estructural de flagelina de *S. typhimurium* descrito por M. McClelland et al., en *Nature*, vol. 413, p. 852 (2001). Por ejemplo, el gen puede ser adquirido mediante la realización de la amplificación a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN o ADNc cromosómicos de *S. typhimurium* como una plantilla con las secuencias de SEQ ID NOs: 1 y 2 como un par de cebadores.

Un gen que codifica la flagelina de cólera está disponible basado en el gen estructural de flagelina de *Vibrio cholerae* descrito por Heiderberg et al., en *Nature*, vol. 406, p. 477 (2.000). Por ejemplo, el gen puede ser adquirido por la realización de la amplificación a través de PCR que usa la cromosoma ADN o ADNc de *V. cholerae* como una plantilla con las secuencias de SEQ ID NOs: 3 y 4 como un par de cebadores.

Un gen que codifica la flagelina de disentería está disponible sobre la base del gen estructural de flagelina de *Shigella dysenteriae* descrito por Tominaga A. et al., en *Genes Genet. Syst.*, vol. 76, p. 111 (2001). Por ejemplo, el gen puede ser adquirirse mediante la realización de la amplificación a través de PCR, utilizando el cromosoma de ADN o ADNc de *S. dysenteriae* como una plantilla, con las secuencias de SEQ ID NOs: 5 y 6 en la lista de secuencias como un par de cebadores.

2. Preparación de vector de expresión de flagelina

El gen de flagelina preparado como en el apartado 1 anterior se incorpora en un plásmido para preparar un vector de expresión. No hay limitación particular el plásmido usado para preparar un vector de expresión, mientras que un plásmido pueda efectuar la expresión en bacterias intestinales. Un plásmido derivado de un microorganismo perteneciente al género *Bifidobacterium* (por ejemplo, pTB4, pTB6, pTB10, pBL67 o pBL78), un plásmido derivado de un microorganismo perteneciente al género *Streptococcus* (por ejemplo, el plásmido pC194), y similares se utilizan. Además, estos plásmidos se pueden complejar con un plásmido de *Escherichia coli* (véase la Publicación de Patente japonesa abierta N^o. 5-130876, por ejemplo).

En vista de la expresión estable y la facilidad de la preparación de ADN para la preparación de una cepa transformada, un plásmido complejo de un plásmido de *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) con un plásmido de *Escherichia coli* es preferible entre los plásmidos descritos anteriormente.

En vista de selección para una cepa transformada, el vector de expresión tiene preferiblemente un marcador seleccionable tal como resistencia a antibióticos, auxotrofia, o similares.

El vector de expresión tiene preferiblemente una secuencia de control para expresar o ventajosamente expresar la flagelina. Los ejemplos de la secuencia de control incluyen secuencias promotoras, secuencias líderes, secuencias de propéptido, secuencias potenciadoras, secuencias de señal, secuencias de terminación, y similares. No hay ninguna limitación particular sobre el origen de la secuencia de control, siempre y cuando se efectúe la expresión en bacterias intestinales. No hay ninguna limitación particular en la secuencia del promotor, siempre que efectúe la expresión en bacterias intestinales.

No hay ninguna limitación particular en una secuencia promotor, siempre que efectúe la expresión de la bacteria intestinal. En vista de expresión eficiente, una secuencia promotor de una proteína similar a histona (HU) (en adelante, puede ser denominado como un "promotor HU") de *B. longum* se usa preferentemente. Por ejemplo, un gen promotor HU puede obtenerse mediante la amplificación y la recuperación de la secuencia de las posiciones de nucleótido 1 al 192 en los genes HU de SEQ ID N^{os}: 9 y 10 (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (3), 598 a 603 (2002)), utilizando el cromosoma de ADN o ADNc de *B. longum* como una plantilla con las secuencias de SEQ ID 7 y 8 NOS en la lista de secuencias como un par de cebadores. Para facilitar la incorporación en un plásmido, un sitio de enzima de restricción apropiada se puede incluir en una secuencia de cebador (HindIII para SEQ ID N^o: 7, NcoI para

SEQ ID N°: 8).

Además, en vista de la mejora de la eficiencia de expresión, una secuencia del terminador está preferiblemente incluida. Como la secuencia de terminador, la secuencia terminadora del gen HU se utiliza preferentemente, que
5 corresponde a una secuencia de bases en las posiciones 475 a 600 de SEQ ID N°: 9.

Además de lo anterior, una secuencia líder, una secuencia de propéptido, una secuencia potenciadora, una secuencia señal, y similares pueden estar dispuestos según sea necesario. Por ejemplo, es preferible contener una
10 secuencia líder y una secuencia señal para la secreción de modo que la flagelina puede ser secretada fuera de la célula del microorganismo.

De esta manera, las secuencias de control, tales como una secuencia promotora y una secuencia terminadora, y un gen marcador seleccionable están incorporados en el plásmido según sea necesario, para preparar un vector de
15 clonación. Por ejemplo, un enlazador que tiene un sitio de multiclonación se dispone preferentemente aguas abajo del promotor del vector de clonación. Al utilizar tal enlazador, un gen (ADN) que codifica la flagelina se incorpora aguas abajo del promotor de modo que la flagelina se puede expresar en marco.

Los ejemplos del plásmido para un vector de clonación incluyen pBLES100, pBLEM100, y similares. FIG. 1 muestra una vista esquemática de la estructura de pBLES 100. El plásmido pBLES100 incluye el vector *Escherichia coli*
20 derivado de pBR322, fragmento de PstI-EcoRI y fragmento de PstI-HindIII (en total 4,4 kbp; parte de la línea en la FIG. 1), fragmento PstI-PstI de vector de *B. longum* derivado de pTB6 (3,6 kbp:.. porción de banda negra en la FIG. 1), y una región que codifica espectinomicina adeniltransferasa derivada de *Enterococcus faecalis* (SpR) (1,1 kbp: flecha dibujada en FIG. 1).

Por ejemplo, un plásmido pBLES100 se prepara como sigue. pTB6, que es un plásmido derivado de *B. longum*, se
25 escindió con PstI, y se insertó en el sitio PstI de *Escherichia coli* de vector de clonación pBR322 (fabricado por Takara Bio Inc.). Además, una región de fragmento de HindIII-EcoRI que codifica SpR de *Enterococcus faecalis* se inserta en el sitio EcoRI-HindIII de pBR322.

Los fragmentos adquiridos para secuencia promotora y el gen de flagelina HTJ (en adelante, puede ser referido como un "gen F1iC") se incorporan en el marco en este plásmido pBLES 100 para preparar un vector que expresa la
30 flagelina. Más específicamente, el fragmento del gen de flagelina que se prepara mediante la amplificación por PCR se realiza utilizando el ADN cromosómico de *S. typhimurium* como una plantilla con la secuencia de la SEQ ID N°: 1, que tiene el sitio de escisión NcoI y la secuencia de la SEQ ID NO: 2 que tiene el sitio de escisión BamHI como un par de cebadores, y el fragmento amplificado se escinde con NcoI y BamIII. El fragmento promotor de HU se prepara por que la amplificación PCR se realiza utilizando el ADN cromosómico de *B. longum* como una plantilla con un cebador de la SEQ ID NO: 7 que tiene el sitio HindIII y un cebador de SEQ ID NO: 8 que tiene el sitio NcoI como un
35 par de cebadores, y el fragmento amplificado se escinde con HindIII y NcoI. Estos fragmentos se ligaron a pBLES100 escindido con HindIII y BamHI. Por lo tanto, se obtiene un vector de expresión de flagelina pBLES-F1iC en el que el gen de flagelina de salmonela ("flagelina" en la FIG. 2) se incorpora aguas abajo del gen promotor HU ("hupP" en la FIG. 2). FIG. 2 muestra este vector de expresión pBLES-F1iC. El vector de expresión de flagelina así obtenida se utiliza para la transformación de las bacterias intestinales.

Para la expresión secretora fuera de la célula del microorganismo, un vector se puede usar que se realiza mediante
45 la incorporación de fragmentos para el gen de secreción del péptido señal y para el gen de flagelina (gen F1iC) en marco en el plásmido pBLES100. Más específicamente, el fragmento del gen de flagelina que se prepara mediante la amplificación por PCR se realiza usando ADN cromosómico de *S. typhimurium* como una plantilla con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 que tiene el sitio de escisión NcoI y la secuencia de la SEQ ID NO: 2 que tiene el sitio de escisión BamHI como un par de cebadores, y el fragmento amplificado se escinde con NcoI y BamHI. El fragmento de gen del péptido señal de secreción se prepara por que la amplificación por PCR se realiza usando
50 ADN cromosómico de *B. bifidum* como una plantilla con un cebador de SEQ ED 15 NO: 11 que tiene el sitio HindIII y un cebador de SEQ ID NO: 12 que tiene el sitio NcoI como un par de cebadores, y el fragmento amplificado se escinde con HindIII y NcoI. Estos fragmentos se combinan con pBLES 100 escindido con BamHI y HindIII. Por lo tanto, un vector de expresión secretora de flagelina pBLESSP-F1iC se obtiene en el que el gen de flagelina de salmonela se incorpora aguas abajo del fragmento de gen del péptido señal de secreción. El vector de expresión de flagelina así obtenida se utiliza para la transformación de las bacterias intestinales.

3. Preparación de microorganismo transformado de expresión de flagelina

No hay ninguna limitación particular en el microorganismo huésped en el que la flagelina se expresa, siempre y cuando la bacteria es viable en el intestino grueso y el intestino delgado de seres humanos o animales (bacteria
60 intestinal). Cuando la bacteria huésped crece en el intestino, se expresa la flagelina. La flagelina expresada ejerce la antigenicidad, por el cual se induce un anticuerpo. Cualquier bacteria viable en el intestino (es decir, las bacterias intestinales), comúnmente llamados bacterias buenas, tales como bifidobacterias o bacterias del ácido láctico pueden utilizarse favorablemente.
65

Los ejemplos preferibles del microorganismo incluyen microorganismos pertenecientes al género *Bifidobacterium*, el género *Lactobacillus*, el género *Lactococcus*, el género *Pediococcus*, el género *Streptococcus*, el género *Enterococcus*, el género *Leuconostoc*, el género *Tetragenococcus*, el género *Oenococcus*, y el género *Weissella* (también denominados colectivamente como "bacterias del ácido láctico").

5 Los ejemplos de los microorganismos que pertenecen al género *Bifidobacterium* (también referidos colectivamente como "bifidobacteria") incluyen *Bifidobacterium adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. globosum*, *B. indicum*, *B. infantis*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. parvulorum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*, *B. pulorum*, *B. ruminale*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovii*, *B. subtile*, *B. suis*, *B. thermacidophilum*, y *B. thermophilum*.

15 De éstos, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum*, y *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* se utilizan preferentemente.

20 Los ejemplos de los microorganismos que pertenecen al género *Lactobacillus* incluyen *Lactobacillus acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. brevis*, *L. brevis* subsp. *gravesensis*, *L. L. buchneri*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *plantarum*, *L. casei* subsp. *tolerans*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. divergens*, *L. fermentum*, *L. fructosus*, *L. gasseri*, *L. hilgardii*, *L. kefir*, *L. leichmannii*, *L. paracasei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. sakei* subsp. *sakei*, *L. sanfrancisco*, *L. vaccinostreus*, *Lactobacillus* sp.

25 Ejemplos de microorganismos pertenecientes al género *Lactococcus* incluyen *Lactococcus garvieae*, *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. plantarum*, y *L. raffinolactis*.

30 Ejemplos de microorganismos pertenecientes al género *Pediococcus* incluyen *Pediococcus pentosaceus* y *P. acidilactici*.

Ejemplos de microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus* incluyen *Streptococcus bovis*, *S. cremoris*, *S. faecalis*, *S. lactis*, *S. pyogenes* y *S. thermophilus*.

35 Ejemplos de los microorganismos pertenecientes al género *Enterococcus* incluyen *Enterococcus casseliflavus* y *E. faecalis*.

Ejemplos de microorganismos pertenecientes al género *Leuconostoc* incluyen *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

40 Ejemplos de microorganismos pertenecientes al género *Tetragenococcus* incluyen *Tetragenococcus halophilus* y *T. muraticus*.

Ejemplos de microorganismos pertenecientes al género *Oenococcus* incluyen *Oenococcus oeni*.

45 Ejemplos de microorganismos pertenecientes al género *Weissella* incluyen *Weissella viridescens*.

50 No hay ninguna limitación particular sobre el método para introducir un vector de expresión de flagelina en bacterias intestinales, y métodos comúnmente utilizados por los expertos en la técnica pueden utilizarse. Ejemplos de los mismos incluyen métodos de electroporación; Fosfato de calcio; lipofección; el uso de iones de calcio; protoplasto; y similares. La electroporación se usa preferiblemente. La electroporación se puede realizar en 0,5 a 20 kV / cm y 0,5 µsec a 10 mseg, más preferiblemente de 2 a 10 kV / cm y 50 µsec a 5 mseg.

55 Una cepa transformada se selecciona con un marcador seleccionable contenido en el vector de expresión de flagelina. Un medio para el cultivo de la cepa transformada puede ser cualquier medio adecuado para el microorganismo huésped. Ejemplos del medio incluyen el medio de agar de hígado en la sangre (BL), de medio de agar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS), medio de agar de medio anaerobio Gifu (GAM), medio de agar de la mejora de GAM (TGAM), un medio de agar Briggs y medio de agar de peptona de glucosa de levadura (YGP). Para la presión de selección, los antibióticos pueden añadirse al medio, o los aminoácidos pueden ser de suprimir o añadir al medio, dependiendo del marcador seleccionable.

60 La expresión de flagelina en un microorganismo transformado puede ser confirmado, por ejemplo, usando la transferencia de Western. La expresión de flagelina puede ser confirmado por que: En primer lugar, el microorganismo transformado se lisaron, por ejemplo, usando un tensioactivo no iónico, incluyendo éster de sorbitán polioxietileno (Tween (marca registrada) 20, 40, 60, 65, 80, 85), y éster de sorbitán (Span (marca registrada) 20, 40, 60, 65, 80, 85), y similares; después se diluyó con tampón fosfato, tampón de citrato, tampón de borato, tampón de tris(hidroximetil)aminometano (Ts)-hidroclorida, o similares; luego se sometió a electroforesis con gel de

dodecilsulfato de sodio poliacrilamida (SDS-PAGE), tris-glicina-gel de poliacrilamida, o similares; después se transfirió a la membrana de nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVF) de la membrana, o similares; y luego se hace reaccionar con un anticuerpo (inmunoglobulina G (IgG)) contra flagelina, y reaccionar adicionalmente con un anticuerpo secundario con un marcador fluorescente. Para la expresión secretora de flagelina por un microorganismo transformado, que puede ser confirmado con posterioridad a la selección para la cepa transformada, un sobrenadante se obtiene a través de la separación centrífuga y sometidos a Western Blot como descrito arriba.

El microorganismo transformado en que la expresión de flagelina se ha confirmado se puede cultivar, se recuperó, y se utilizó directamente para la producción de una formulación, utilizando cualquier método comúnmente utilizado por aquellos expertos en la técnica. Alternativamente, el microorganismo transformado puede utilizarse en una forma seca. El microorganismo transformado puede ser secado por el tratamiento en el que se realiza un tratamiento a baja temperatura, tales como liofilización o secado a baja temperatura, de modo que el microorganismo puede crecer cuando se expone a condiciones de crecimiento tales como los de un medio intestinal o un medio.

4. La producción de una formulación de cápsula resistente a los ácidos que contiene el microorganismo transformado.

Con el fin de permitir que el microorganismo transformado que expresa una proteína de flagelina para actuar como una vacuna oral, el microorganismo transformado tiene que pasar a través del estómago, alcanzar el intestino, y crecer en él. Sin embargo, bacterias intestinales ingeridas mayoritariamente por vía oral, tales como bacterias del ácido láctico, mueren debido a pH en el estómago significativamente bajo, el pH de 1 a 3. Por lo general, se dice que la relación de las bacterias intestinales que alcanzan el intestino manteniendo al mismo tiempo su capacidad para proliferar es un 10000^o o menos de la cantidad de bacterias administradas. En consecuencia, con el fin de utilizar el microorganismo transformado según la presente invención, es necesario evitar que el microorganismo transformado se vea afectado por el ácido gástrico de modo que el microorganismo transformado puede alcanzar el intestino humano vivo y crecer en el intestino para expresar flagelina.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una formulación en cápsula que el microorganismo transformado se encapsula con o envuelto en una membrana de la cápsula resistente a los ácidos, en la otra palabra, el fármaco está en forma de una formulación de cápsula en la que el microorganismo transformado está contenido dentro de una cápsula que tiene una membrana resistente a los ácidos. No hay ninguna limitación particular sobre la configuración, la forma, o similares de la formulación de la cápsula, siempre y cuando la membrana es resistente al ácido gástrico. Específicamente, la configuración es deseable que evita que el ácido gástrico penetre en la cápsula y en contacto con el microorganismo transformado. La membrana de la cápsula puede ser una membrana insoluble a un pH de 4 o inferior, preferiblemente a un pH de 1 a 3. No hay ninguna limitación particular sobre el método para la encapsulación.

Formulación de cápsula sin costuras

La cápsula para proporcionar con resistencia al ácido gástrico puede estar preferiblemente en la forma de una cápsula sin costuras. En este documento, la "cápsula sin costuras" se refiere a un tipo de cápsula blanda en la que los contenidos se envuelve en una membrana sin costuras. La cápsula sin costuras puede tener una estructura de múltiples capas que consta de dos o más capas, y preferiblemente tiene una estructura de múltiples capas que consta de tres o más capas. Típicamente, una capa más interna puede contener los contenidos (siendo el microorganismo transformado en el caso de la presente invención), y una capa externa (o la capa más externa) puede actuar como membrana. Específicamente, el microorganismo transformado se encapsula con la membrana.

En lo sucesivo, la preparación de una formulación de cápsula transparente de tres capas se describirá. FIG. 3 es una vista esquemática en una vista de sección transversal de una formulación de cápsula transparente de tres capas. Esta estructura de tres capas consiste en una capa más interna, una capa intermedia que cubre la capa interna, y una capa externa que cubre la capa intermedia.

La capa más interna incluye el microorganismo transformado y un disolvente no acuoso o componente sólido para suspender o mezclar el microorganismo transformado (en lo sucesivo, componente que se conoce como una "sustancia capa más interna"). No hay ninguna limitación particular sobre la sustancia capa más interna. Ejemplos de los mismos incluyen diversas grasas y aceites, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de azúcares, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, éteres lineales, ésteres de ácidos grasos superiores, alcoholes superiores, y terpenos. Ejemplos específicos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de palma, aceite de almendra de palma, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de colza, manteca de cacao, sebo de vaca, manteca de cerdo, caballos de aceite, aceite de ballena, la grasa y los aceites de estas grasas naturales y los aceites tienen un punto de fusión de 40 ° C o menos, margarina, manteca hidrogenada, ésteres de glicerina de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, aceites de alcanfor, el aceite de menta, a-pinene, D-limoneno, y similares. Estas sustancias de capa más interna se pueden utilizar solas o en una combinación de dos o más.

Un material utilizado para la capa intermedia es, entre las sustancias de capa más interna enumeradas anteriormente, un material que tiene un punto de fusión de 20 ° C a 50 ° C y diferente de la sustancia de capa más interna, más preferiblemente un material que se encuentra en estado sólido a temperatura ambiente. Como, en los ejemplos expuestos a continuación, aceite de palmiste de hidrogenado que tiene un punto de fusión de 34 ° C y el aceite de almendra de palma hidrogenado que tiene un punto de fusión de 43 ° C se utilizan como la sustancia de capa más interna y el material de capa interior, respectivamente, las mismas especies de grasa y aceites se pueden utilizar como la sustancia de capa más interna y el material de capa interior, que se sometió a hidrogenación a fin de tener diferentes puntos de fusión. Esta capa intermedia puede actuar como la prevención de la permeación de agua y oxígeno y la prevención de contacto con ácido gástrico. El material a ser seleccionado puede ser determinado en consideración de la duración del almacenamiento de la cápsula y similares.

Un material utilizado para la capa exterior (siendo la capa más externa en el caso de una estructura que tiene tres o más capas) puede ser una mezcla de una proteína y un alcohol polihídrico soluble en agua; una mezcla de una proteína, un alcohol polivalente soluble en agua, y un polisacárido; una mezcla de un polisacárido y un alcohol polivalente soluble en agua; o similar. Los ejemplos de la proteína incluyen gelatina y colágeno. Ejemplos del alcohol polivalente soluble en agua incluyen sorbitol, manitol, glicerina, propilenglicol, y polietilenglicol. Ejemplos de polisacárido incluyen agar, goma de gelano, goma de xantano, goma de algarroba, pectina, alginato, carragenina, goma árabe, dextrina, dextrina modificado, almidón, almidón modificado, pululano, pectina, y la sal de carboximetilcelulosa. En el caso en que se utiliza pectina, alginato, goma de gelano, o carragenina, una sal de metal alcalino o una sal de metal alcalino-térreo se pueden añadir según sea apropiado.

La formulación de cápsula transparente de tres capas se prepara utilizando cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, tales como el método de goteo utilizando una boquilla triple descrito en la patente japonesa nº 1398836. En este método de goteo, la sustancia de capa más interna combina con el microorganismo transformado (por ejemplo, se secó por congelación las células del microorganismo), que es preferiblemente una suspensión del microorganismo transformado (preferiblemente, las células liofilizadas de microorganismo) en un material disolvente hidrófobo que es no fluido a de 20 a 50 ° C, desde la boquilla más interna de la boquilla triple concéntrica, un material formador de capa intermedia (por ejemplo, un líquido obtenido por la fusión de un material en la forma de un sólido a temperatura ambiente) de la boquilla intermedia y una solución de un material que forma la capa exterior (membrana) de la boquilla más externa se expulsan de forma simultánea, y se dejó caer en un líquido portador (por ejemplo, aceite de maíz, aceite de colza, o similares), que fluye bajo enfriamiento, formando así una cápsula "sin costuras" de tres capas en el microorganismo transformado está contenido en la capa más interna. En consecuencia, el microorganismo transformado se encapsula con o envuelto en la membrana sin costuras.

La cápsula formada de este modo se seca a continuación. Por ejemplo, el secado se realiza por la ventilación a temperatura ambiente. Típicamente, la cápsula se seca, por ejemplo, en el aire a 5 ° C a 30 ° C. El tiempo de secado es preferiblemente de 2 a 12 horas. Como se describe en la Publicación de Patente Japonesa abierta Nº 07-069867, una cápsula que se ha secado ordinariamente como se describe anteriormente puede ser sometido además, preferiblemente, al vacío o liofilización al vacío. El grado de vacío se puede mantener en 0,5 a 0,02 torr. La cápsula puede ser congelado y se secó a -20 ° C o inferior en el caso de secado por congelación al vacío. No hay ninguna limitación particular sobre el tiempo de secado al vacío o secado por congelación al vacío, pero es típicamente de 5 a 60 horas, preferiblemente de 24 a 48 horas. Si el tiempo es más corto que 5 horas, el secado es insuficiente y el agua presente en la cápsula puede afectar negativamente el contenido.

En el caso de una cápsula obtenida usando el método descrito en la Publicación de Patente Japonesa Abierta Nº 07-069867, el agua se elimina suficientemente de la cápsula mediante secado por congelación al vacío, y, por tanto, el valor Aw puede ser de 0,20 o menos, y la conductividad de calor puede ser 0,16 kcal/mh ° C o menos. Por secado al vacío o secado por congelación al vacío, la cantidad de agua se reduce, naturalmente, mientras que la cápsula está suficientemente seca y se vuelve porosa. Por lo tanto, la conductividad térmica es significativamente menor que en el caso en que se realiza simplemente por secado ordinario.

El valor Aw no se refiere a un contenido absoluto de agua presente en la muestra, pero a un valor determinado por el estado en el que el agua está presente, es decir, los grados de libertad para el agua en la muestra. El valor Aw es un indicador que indica el agua que puede afectar directamente a la reacción química o el crecimiento de microorganismos, y se mide utilizando un método de medición de la actividad de resistencia eléctrica de agua (por ejemplo, contador Aw WA-360, Shibaura Electronics Co., Ltd.). La conductividad térmica se mide usando el método de Fitch o similar. El valor Aw es preferiblemente 0,20 o menos, y la conductividad térmica es preferiblemente de 0,02 a 0,08 kcal/mh°C.

Con el fin de proporcionar a la membrana de la cápsula de la formulación de cápsula transparente con resistencia a los ácidos, se forma una capa externa resistente a los ácidos o se trata la membrana (la capa más externa) de la cápsula transparente preparada de modo que sea resistente a los ácidos.

Los ejemplos del método para la formación de una capa externa resistente a los ácidos incluyen la adición de la pectina, alginato, goma árabe, o similares en una cantidad de 0,01 a 20% en peso, preferiblemente de 0,1 a 10% en peso a la gelatina, agar, carragenano, o similares, que tiene una capacidad de gelificación.

Ejemplos del método para proporcionar la membrana (la capa más externa) de la cápsula sin costuras preparado con resistencia a los ácidos incluyen la reticulación de la capa exterior (la capa más externa) de la cápsula transparente y revestimiento de la superficie de la cápsula sin costura, que puede realizarse solo o en combinación.

5 Para la reticulación de la capa externa que contiene una proteína, la cápsula transparente se prepara primero, y luego se lava suficientemente con agua y, a continuación, se añade la cápsula transparente lavado con agua a una solución acuosa que contiene un agente de reticulación. Por lo tanto, la superficie de la capa externa se somete a un tratamiento de reticulación. Como agente de reticulación, se pueden usar agentes de reticulación conocidos convencionalmente. Ejemplos de agentes de reticulación incluyen formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, 10 glioxal, glutaraldehído, cinamaldehído, vanilil aldehído, acetona, cetona de metil etil, óxido de etileno, óxido de propileno, el alumbre de potasio, y el alumbre de amonio. Típicamente, la capa exterior es tratada mediante la adición de 1 parte en peso de la cápsula sin costuras a 50 a 100 partes en peso de solución acuosa que contiene 0,1 a 2 w/v%, preferiblemente de 0,5 a 2 w/v%, de un agente de reticulación, y agitando la mezcla durante 10 a 300 segundos. Aquí, la cantidad de agente de reticulación usado y el período de tiempo para la acción variará 15 dependiendo del tipo del agente de reticulación. Después de que la superficie de la membrana externa se someta al tratamiento de reticulación, la membrana externa se lava suficientemente con agua para eliminar la solución acuosa que contiene el agente de reticulación, y el agua en la capa exterior se seca.

20 Para la reticulación de la capa externa que contiene proteínas, la reticulación se puede realizar a través de tratamiento enzimático con transglutaminasa. En este caso, la capa exterior es tratada mediante la adición de 1 parte en peso de cápsula transparente producida a 50 a 100 partes en peso de solución acuosa que contiene 0,1 a 10 w / v%, preferiblemente de 0,5 a 2 w / v%, de enzima, y se agita la mezcla durante 1 a 300 minutos. El resultado se lava con agua y se seca como se ha descrito anteriormente.

25 Para el recubrimiento, después de que la cápsula transparente húmedo producida se haya secado, la cápsula transparente está convencionalmente recubierta con goma laca, etilcelulosa, ropilmetilcelulosa hidroxipo, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, celulosa TC-5, acetato de vinil-vinilpirrolidona copolímero, zeína, cera de etileno, o similares como el material de base, y aceite de ricino, aceite de colza, ftalato de dibutilo, polietilenglicol, 30 glicerina, ácido esteárico, éster de ácido graso, pairnitato de sorbitán, estearato de polioxi-etileno, monoglicérido acetilado, o similares como el plastificante.

La membrana de la cápsula puede estar provista además de entericidad. De este modo, la cápsula está protegida de una solución ácida y similares (tal como el ácido gástrico) en el estómago, y se desintegra en el intestino de manera que el microorganismo transformado se libera desde el interior de la cápsula para efectuar suficientemente la 35 producción de antígeno en el intestino. La membrana de la cápsula puede estar provista de entericidad mediante la producción de una cápsula entérica como se practica comúnmente por los expertos en la técnica. Una mezcla de gelatina y pectina se puede utilizar como material de la capa exterior de la cápsula sin costura para convertir la membrana en entérica. La capa externa resistente a los ácidos está provista además de entericidad mediante la preparación mediante la adición de pectina, alginato, goma árabe, o similares en una cantidad de 0,01 a 20% en peso, preferiblemente de 0,1 a 10% en peso a la gelatina, agar, carragenina, o similares, que tiene una capacidad de 40 gelificación.

La formulación de la cápsula transparente puede estar en la forma de una esfera debida al método de producción. El tamaño medio de las partículas de la cápsula sin costura es de 0,3 a 10 mm, preferiblemente de 1,5 a 8,0 mm. 45

La formulación de la cápsula transparente obtenida de esta manera se puede almacenar durante seis meses o más mientras se mantiene la actividad del microorganismo transformado a temperatura ambiente. Si la formulación se almacena a 10°C o menos, el almacenamiento extendido durante un año o más es posible.

50 Formulación de cápsula blanda

Como en el caso de la formulación en cápsulas sin costura, una formulación de cápsula blanda puede ser la encapsulación de una suspensión del microorganismo transformado en un disolvente no acuoso (como el contenido de la cápsula) con una lámina de membrana. El material de la lámina de membrana es como se ha mencionado para 55 la capa exterior de la cápsula sin costuras.

Una formulación de capsula blanda se puede preparar usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, como se describe en la patente japonesa nº 2999535. Por ejemplo, usando una matriz rotativa, mientras que los contenidos se inyectan, y se llenan, la lámina de membrana se calienta a través de la matriz, con el fin de envolver y 60 encapsular los contenidos. Para la acción de liberar el microorganismo transformado en el intestino, un aceite, que es un agente liberador, se elimina de la cápsula blanda resultante a través de un lavado con un disolvente polar (por ejemplo, metanol, etanol, propanol o isopropanol). Posteriormente, la cápsula puede hacerse resistente a los ácidos mediante la realización de un tratamiento de reticulación y el tratamiento de recubrimiento en combinación, o la realización de uno cualquiera de los tratamientos, como en el caso de la cápsula sin costuras.

65 La lámina de membrana resistente a los ácidos puede prepararse también sobre la base de cualquiera de los

métodos conocidos tales como mediante la adición de pectina, alginato, goma árabe, o similares en una cantidad de 0,01 a 20% en peso, preferiblemente de 0,1 a 10% en peso a la gelatina, agar, carragenano, o similar, que tiene una capacidad gelificante. Alternativamente, la lámina de membrana se puede hacer resistente a los ácidos, al realizar el tratamiento de reticulación y el tratamiento de recubrimiento en combinación, o la realización de uno cualquiera de los tratamientos. La lámina de membrana resistente a los ácidos así obtenido puede ser utilizado para producir una formulación de cápsula blanda en la que el microorganismo transformado se encapsula con la membrana resistente a los ácidos. Por ejemplo, a partir de la lámina obtenida de membrana resistente a los ácidos se obtiene la forma de una cápsula, los contenidos se introducen en la cápsula, y luego una costura de la cápsula se funde y se unen con el fin de envolver los contenidos, utilizando técnicas conocidas.

La formulación de cápsula blanda puede estar en la forma de una esfera, una elipse, o un rectángulo. La cápsula blanda tiene preferiblemente un eje mayor de 3 a 16 mm y un eje menor de 2 a 10 mm, y más preferiblemente tiene un eje mayor de 5 a 7 mm y un eje menor de 2 a 3 mm.

La formulación de cápsula blanda obtenida de esta manera se puede almacenar durante seis meses o más mientras se mantiene la actividad del microorganismo transformado a temperatura ambiente. Si la formulación se almacena a 10 ° C o menos, un almacenamiento prolongado por un año o más es posible.

Formulación de cápsula dura

Una formulación de cápsula dura puede producirse al moldear una membrana de la cápsula en un cuerpo y una tapa de antemano, llenando el cuerpo de la cápsula con el contenido, y la combinación de la resultante con la tapa de la cápsula.

Ejemplos del material de la membrana de la formulación de cápsula dura incluyen gelatina, celulosa, pululano, carragenano, y derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa. La cápsula dura se puede moldear usando cualquiera de los métodos comúnmente utilizados por los expertos en la técnica. La cápsula moldeada puede consistir en cápsulas disponibles comercialmente. El contenido puede abarcarse y envolverse en la membrana.

Los contenidos pueden ser una mezcla obtenida por mezclado suficiente del microorganismo transformado con un vehículo (por ejemplo, anhídrido silícico, silicato de aluminio sintético, lactosa, almidón de maíz, o celulosa cristalina), o polvos que contienen polvos secos del microorganismo transformado.

Después de que los contenidos se almacenen en la cápsula, la membrana de la cápsula puede estar recubierta. Para este recubrimiento, los materiales y los métodos que se han mencionado para la capa exterior de la cápsula sin costuras pueden aplicarse para proporcionar la membrana con resistencia a los ácidos y preferiblemente desintegrabilidad en el intestino (entericidad). Este recubrimiento también permite que la membrana de la cápsula pueda sellarse a fin de encapsular el contenido.

La lámina de membrana resistente a los ácidos también puede prepararse en base a cualquiera de los métodos conocidos, tales como a través de la adición de pectina, alginato, goma árabe, o similares en una cantidad de 0,01 a 20% en peso, preferiblemente de 0,1 a 10% en peso a la gelatina, agar, carragenano, o similar, que tiene una capacidad de gelificación. Alternativamente, la lámina de membrana se puede hacer resistente a los ácidos, al realizar el tratamiento de reticulación y el tratamiento de recubrimiento en combinación, o la realización de uno cualquiera de los tratamientos. La lámina de membrana resistente a los ácidos obtenida de este modo puede ser utilizada para producir una formulación de cápsula dura en la que el microorganismo transformado está encapsulado por la membrana resistente a los ácidos. Por ejemplo, a partir de la lámina obtenida de membrana resistente a los ácidos se obtiene la forma de una cápsula dura, los contenidos se introducen en la cápsula dura formada, y luego una costura de la cápsula se funde y se une con el fin de envolver los contenidos, utilizando una técnica conocida.

La formulación cápsula dura así obtenida puede almacenarse durante seis meses o más, mientras que se mantenga la actividad del microorganismo transformado a temperatura ambiente. Si la formulación se almacena a 10 ° C o menos, el almacenamiento extendido durante un año o más es posible.

5. Vacuna Oral contra una enfermedad infecciosa bacteriana

Después de la administración oral, la formulación de cápsula resistente a los ácidos (la formulación en cápsulas sin costura, la formulación en cápsula blanda, y la formulación en cápsula dura) obtenida como se explica en la Sección 4 que se describe anteriormente pasa a través del estómago, teniendo un pH de 1 a 3, alcanza el intestino y, a continuación, se desintegra en el intestino. El microorganismo transformado se libera a través de la desintegración de la formulación, crece, produce, y preferiblemente segrega flagelina fuera de la célula del microorganismo en un entorno intestinal. La flagelina entonces es reconocido como un antígeno para producir un anticuerpo. Por consiguiente, la formulación de cápsula resistente al ácido puede ser una vacuna oral eficaz contra un microorganismo que tiene la flagelina.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá a modo de ejemplos, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos.

5 Ejemplo 1: Preparación de la formulación de la cápsula resistente a los ácidos que contiene antígeno de fiebre tifoidea que produce bifidobacteria

A. La amplificación del gen de flagelina *S. Typhimurium* a través de PCR.

10 *S. typhimurium* ATCC 14028 se cultivó en el medio LB (fabricado por Invitrogen) a 37 ° C durante 12 horas. Después de finalizado el cultivo, el ADN genómico fue extraído convencionalmente a partir de *S. typhimurium*. El ADN genómico extraído se amplificó usando un kit para la reacción de PCR (fabricado por Applied Biosystems) con polimerasa de ADN Ampli Taq (0,5 unidades) de acuerdo con la instrucción. Como par de cebadores, se utilizaron los siguientes: SEQ ID NO: 1 (hacia delante): 5'-CATGCCATGGATGGCACAGTCATTAATACA-3' (CCATGG en las posiciones 5 a 10 es el sitio de escisión NcoI), y SEQ ID No: 2 (inversa): 5'-CGCGGATCCTTAACGCAGTAAAGAGAGGAC-3' (GATCCT en las posiciones 5 a 10 es el sitio de escisión BamHI). El PCR se realizó usando 40 µL de líquido de reacción que contiene 125 ng de plantilla de ADN, 0,5 µmol de cada cebador, 2,5 unidades de Pfu de polimerasa ADN, 4 µL de x10 de solución de tampón para el la polimerasa de ADN Pfu, y 200 µmol de cada dNTP, bajo 30 ciclos a 94 ° C durante 1 minuto, a 55 ° C durante 1 minuto, y a 72 ° C durante 1 minuto, y luego a 72 ° C durante 10 minutos. Después de la finalización de la PCR, el producto resultante se escindió con NcoI y BamHI. Por lo tanto, el fragmento de gen de flagelina se preparó.

B. La amplificación del promotor HU a través de PCR

25 B. La cepa *longum* ATCC 15703 fue cultivada en medio MRS (fabricado por Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.) a 37 ° C durante 12 horas. Después de finalizado el cultivo, el ADN genómico fue extraído convencionalmente a partir de *B. longum*. El PCR se realizó como se describió en la Sección A anterior. Como par de cebadores, se utilizaron los siguientes: SEQ ID No: 7 (hacia delante): 5'-CGCCAAGCTTTGGGCGCGGCCATGAAG-3' (AAGCTT en las posiciones 5 a 10 es el sitio de escisión HindIII), y SEQ ID NO: 8 (inversa): 5'-CGGCCATGGAAAGCATCCTTCTTGGGTCA-3' (CCATGG en las posiciones 5 a 10 es el sitio de escisión NcoI). Después de la finalización del PCR, el producto resultante se escindió con HindIII y NcoI. De este modo, el fragmento para el gen promotor HU se preparó.

35 C. Preparación del vector de expresión

El plásmido pBLES100 se escindió con BamHI y HindIII, y se combinó con y se ligó al fragmento de gen de flagelina de salmonela preparado en la Sección A como se describe anteriormente y el fragmento de gen promotor HU preparado en la Sección B descrita anteriormente. Así, se obtuvo un vector de expresión pBLES-F1iC.

40 D. Introducción del vector de expresión en *B. Animalis*

45 *B. animalis* ATCC 27536 se inoculó en el medio MRS, y se cultivó hasta la fase de crecimiento semilogarítmica manteniéndose en pie a 37 ° C durante 12 horas bajo la atmósfera de nitrógeno que contiene 10% de carbono dióxido. El cultivo resultante se centrifugó, y se recogieron las células del microorganismo y se lavó tres veces con PBS (obtenido diluyendo 8 g de cloruro sódico, 0,2 g de cloruro de potasio, 1,44 g de hidrógeno fosfato disódico, y 0,24 g de dihidrógeno fosfato de potasio con 1 L de agua destilada, y ajustando el pH a 7,4). A continuación, se añadió PBS a 5×10^8 células / mL con el fin de obtener una suspensión de *B. animalis*. Entonces, 5 µL (1 µg de ADN / 5 µL) de pBLES-F1iC preparado en la Sección C descrito anteriormente se añadió a 50 µL de esta suspensión, y el resultante se coloca en una cubeta de electroporación 0,2 cm de anchura y se trató en las condiciones de 5 µs, 1.000 V para la transformación.

55 El cultivo se realiza en un espectinomicina (50 µg / ml) que contienen medio de agar BL (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd) a 37 ° C bajo la atmósfera de nitrógeno que contiene dióxido de carbono 10%. Así, se obtuvo *B. animalis* transformado.

E. Western Blotting

60 Se exprese o no el *B. animalis* transformado una proteína de flagelina se confirmó como sigue. *B. Animalis* se diluyó con un tampón de fosfato (pH 6,8) que contiene 1 w / v% de Tween (marca registrada) 80 y una solución de tampón A (126 clorhidrato mM Tris, 20 w / v% de glicerina, 4 w / v% de dodecilsulfato de sodio, 1,0 w / v% 2-mercaptoetanol, 0,05 w / v% azul de bromofenol, pH 6,8). Entonces, 5 µg del resultante se sometió a electroforesis (gel de glicina de poliacrilamida-tris), y después se sometió a electrotransferencia para transferir proteínas resueltas a una membrana de nitrocelulosa, y luego se sometió a ELISA con IgG1 (fabricado por ViroStat) específico para flagelina común a especies de *Salmonella* y de anticuerpo secundario de peroxidasa de rábano picante de etiqueta (HRP) (1: 500). Por lo tanto, se confirmó la expresión de flagelina.

F. Preparación de polvo de microorganismo liofilizado del microorganismo transformado

5 En primer lugar, 2 bucles de platino de las transformadas *B. animalis* se inocularon en 1 L de medio MRS (fabricado por Nippon Becto Dickinson Company, Ltd.) que contiene 50 µM de espectinomicina, y se cultivaron a 37 ° C durante 18 horas con la inyección de gas de nitrógeno que contiene el dióxido de carbono 10%. El pH se ajustó a 5,5 con 10M de solución acuosa de hidróxido de sodio por un ajustador de pH automático para evitar la disminución del pH durante el cultivo. Después del cultivo, durante 15 horas, las células se diluyeron apropiadamente con un diluyente anaeróbico, aplicado al medio de agar de BL que contiene 50 µm de espectinomicina y se contaron para el número de células viables de las colonias. Aquí, el diluyente anaeróbico se obtuvo por disolución de 6,0 g de fosfato de hidrógeno disódico, 4,5 g de fosfato de dihidrógeno de potasio, 0,5 g de monohidroquiorida L-cisteína, 0,5 g de Tween (marca registrada) 80, y 1,0 g de agar en 1 L de agua destilada y esterilizando a vapor el resultante a 121 ° C durante 15 minutos.

15 Después del cultivo, las células se recogieron por separación centrífuga (15.000 xg, 20 minutos), y a las células, se añadieron 120 g de agua destilada, 12 g de citrato de sodio y 8 g de malato de sodio para obtener una suspensión de las células. Después, se añadieron 8 g de Avicel FD-101 (fabricado por Asahi Kasei Corporation) a esta suspensión, y el resultante se agitó suficientemente, se congeló, y después se secó en un vacío. Posteriormente, se añadió dextrina en una cantidad dos veces más que los polvos obtenidos. Por lo tanto, los polvos de células de microorganismos liofilizados se obtuvieron.

G. Preparación de formulación de cápsulas ácido-resistentes

25 Como se describe a continuación, la formulación en cápsulas sin costuras resistente a los ácidos que contiene células de microorganismo transformado se preparó usando un aparato de producción de cápsula provista de una boquilla triple coaxial.

30 En primer lugar, se fundió 400 g de aceite endurecido (aceite de almendra de palma hidrogenado que tiene un punto de fusión de 34 ° C) y 100 g de los polvos de células de microorganismos liofilizados obtenidos en la sección F que se ha descrito anteriormente después se dispersó en el mismo. Como se describe a continuación, la formulación en cápsulas sin costuras resistente a los ácidos que contiene las células microorganismo transformado se preparó usando un aparato de producción de cápsula provista de una boquilla coaxial triple. En primer lugar, se fundió 400 g de aceite endurecido (aceite de almendra de palma hidrogenado que tiene un punto de fusión de 34 ° C) y 100 g de los polvos de células de microorganismos liofilizados obtenidos en la sección F se ha descrito anteriormente después se dispersa en el mismo. Esta dispersión de la boquilla más interna de la boquilla triple concéntrica, un aceite endurecido fundido (aceite de almendra de hidrogenado de palma de tener un punto de fusión de 43 ° C) de la boquilla intermedia situada en el lado exterior de la boquilla más interna, y una solución de gelatina (obtenida disolviendo 600 g de gelatina, 300 g de glicerina y 100 g de pectina en 4 kg de agua purificada) de la boquilla más externa expulsada simultáneamente, y goteó en aceite de colza, que fluye bajo enfriamiento a 15 ° C, formando de ese modo una formulación en la que las células de microorganismos transformadas se encapsula en una cápsula transparente de tres capas con un diámetro de 2,5 mm. Esta formulación de cápsulas se secó por la ventilación a 20 ° C durante 10 horas, y luego se secó en vacío a temperatura ambiente. Por lo tanto, el valor de la actividad del agua Aw se redujo a 0,20 o menos y la conductividad de calor se redujo a 0,16 kmal/mh ° C o menos en la cápsula.

H. Preparación de formulación de cápsula blanda resistente a los ácidos

50 En primer lugar, 50 g de polvos de células de microorganismos liofilizados obtenidos en Sección F descritos anteriormente se suspendieron en 300 g de aceite de colza para preparar un contenido de fluido de una cápsula blanda. Después, se añadieron 400 g de gelatina y 100 g de glicerina a 200 g de agua destilada, se agitó a 60 ° C, y se disolvió, y el resultante se conforma en una hoja, obteniendo de ese modo una membrana de gelatina, que se usó como la membrana de la cápsula blanda. Las membranas de gelatina se envían a un espacio entre un par de troqueles de cilíndrica giratoria, y el contenido de fluido fue expulsado a un espacio entre las membranas de gelatina por una bomba que se mueve en relación con los troqueles, formando con ello la encapsulación.

55 A continuación, se colocaron 400 g de los encapsulados en un granulador de rodadura, y una solución obtenida disolviendo 10 g de goma laca y 1 g de aceite de ricino en 400 g de licor mezclado de metanol-acetato de etilo (1:1, v/v) se pulverizó sobre toda la superficie de las cápsulas blandas a un espesor de la membrana de recubrimiento de 0,3 mm. De este modo, se obtuvo que 400 g de formulaciones de cápsula blanda que tiene un eje mayor de 4 mm y un eje menor de 3 mm, encapsulando las células de microorganismo transformado, y que tiene un revestimiento resistente a los ácidos.

I. Preparación de formulación cápsula dura ácido-resistentes

65 Los polvos de células de microorganismos liofilizados obtenidos en la Sección F descritos anteriormente se utilizan como el contenido de una cápsula dura. Para la membrana de la cápsula dura, una cápsula comercialmente disponible de N° 5 como se definió en la Farmacopea Japonesa se utilizó. Los contenidos se llenaron con el cuerpo

de la cápsula, y se combinan con la tapa de la cápsula, formando así la encapsulación.

A continuación, se colocaron 100 g de los encapsulados en un granulador de rodadura, y una solución obtenida disolviendo 10 g de goma laca y 1 g de aceite de ricino en 400 g de acetato de licor mezclado de metanol-acetato (1 v / v) era pulverizada sobre toda la superficie de las cápsulas duras a un revestimiento de espesor de la membrana de 0,3 mm. Por lo tanto, 100 g de formulaciones de cápsula dura que encapsulan los microorganismos de células transformadas y que tienen un revestimiento resistente a los ácidos.

Ejemplo 2: Preparación de la formulación de la cápsula resistente al ácido que contiene bacterias productoras de antígeno de cólera de ácido láctico

V. cholerae ATCC 11628, que produce un antígeno del cólera, se cultivó en un medio LB a 37 ° C durante 12 horas. Después de la compleción del cultivo, el ADN genómico fue convencionalmente extraído a partir de *V. cholerae*. El PCR se realizó como en el Ejemplo 1, utilizando el ADN genómico extraído como una plantilla con las secuencias de SEQ ID NO: 3 (hacia adelante) y SEQ. ID NO: 4 (inversa) como un par de cebadores. El fragmento amplificado resultante se recuperó y se escindió con NcoI y BamHI. Por lo tanto, el fragmento de gen de flagelina de cólera se preparó. Los pBLES-FliC preparó en el Ejemplo 1 se digirió con NcoI y BamHI, y un fragmento grande se recuperó. Este fragmento y el fragmento de gen de flagelina de cólera se ligaron entre sí. De este modo, se obtuvo una cólera que expresa el antígeno de expresión de vector pBLES-Vc.

El vector de expresión de flagelina de cólera pBLESVc obtenido se usó para transformar *Lb. plantarum* ATCC BAA-793 a preparar un *Lb. plantarum* que produce el antígeno de cólera. La expresión del antígeno del cólera se confirmó por ELISA usando la respuesta de anticuerpos de antígeno tal como se explica en la Sección E del Ejemplo 1.

El *Lb. Plantarum* en que se utilizó la expresión de la proteína de flagelina de cólera se confirmó para preparar un polvo de célula de microorganismo liofilizado como en la sección F del Ejemplo 1, y una formulación de cápsula sin costuras y una formulación de cápsula blanda y una formulación de cápsula dura, cada una de las cuales contiene los polvos de células de microorganismos liofilizados, se prepararon, respectivamente, como en las secciones G, H, I y del Ejemplo 1. Las membranas de la formulación de cápsula transparente resultante, la formulación de cápsula blanda y formulación de cápsula dura eran resistentes a los ácidos.

Ejemplo 3: Preparación de la formulación de la cápsula resistente a los ácidos que contienen antígeno de disentería que produce bifidobacterias.

S. dysenteriae ATCC 29026, que produce un antígeno de la disentería, se cultivó en medio LB a 37 ° C durante 12 horas. Después de finalizado el cultivo, el ADN genómico fue convencionalmente extraído a partir de *S. dysenteriae*. El PCR se realizó como en el Ejemplo 1, utilizando el ADN genómico extraído como una plantilla con las secuencias de SEQ ID No: 5 (hacia adelante) y SEQ ID NO: 6 (inversa) como un par de cebadores. El fragmento amplificado resultante se recuperó y se escindió con NcoI y BamHI. Por lo tanto, el fragmento de gen de flagelina de disentería se preparó. Los pBLES-F1iC preparados en el Ejemplo 1 se digirió con NcoI y BamHI, y un fragmento grande se recuperó. Este fragmento y el fragmento de gen de flagelina de disentería se ligaron entre sí. De este modo, se obtuvo un vector pBLES-Sd de expresión de antígeno de disentería.

El vector de expresión de disentería de flagelina pBLES-Sd obtenido se usó para transformar *B. longum* ATCC 15697 para preparar un antígeno de disentería que produce *B. longum*. La expresión del antígeno de disentería se confirmó por ELISA, usando la respuesta de anticuerpos de antígeno tal como se explica en la Sección E del Ejemplo 1.

B. longum en el que la expresión de la proteína de flagelina de disentería se confirmó que se usó para preparar los polvos de células de microorganismos liofilizados como en la sección F del Ejemplo 1, y una formulación de cápsula sin costuras, una formulación de cápsula blanda, y una formulación de cápsula dura, cada uno de los cuales contiene los polvos de células de microorganismos liofilizados, se prepararon, respectivamente, como en las secciones G, H, I y del Ejemplo 1. Las membranas de la formulación de cápsula sin costuras obtenida, formulación de cápsula blanda, y la formulación de cápsula dura eran resistentes de los ácidos.

Ejemplo Comparativo 1

Una formulación de cápsula sin costuras se preparó como en el Ejemplo 1, salvo que la solución de gelatina para la membrana de la sección G del Ejemplo 1 se cambió a un material obtenido mediante la disolución de 600 g de gelatina, 300 g de glicerina y 100 g de sorbitol en 4 kg de agua purificada. La membrana de la farmacéutica obtenida no era resistente a los ácidos.

Ejemplo Comparativo 2

Una formulación de cápsula blanda se preparó como en el Ejemplo 1, salvo que el recubrimiento de la sección H del Ejemplo 1 no se llevó a cabo en la preparación de la cápsula blanda. La membrana de la farmacéutica obtenida no

era resistente a los ácidos.

Ejemplo Comparativo 3

5 Una formulación de cápsulas duras se preparó como en el Ejemplo 1, salvo que el recubrimiento de la Sección I del Ejemplo 1 no se realizó en la preparación de la cápsula dura. La membrana de la farmacéutica obtenida no era resistente a los ácidos.

Ejemplos Comparativos 4 a 6

10 En Ejemplos Comparativos 4 a 6, una formulación de cápsula sin costuras, una formulación de cápsula blanda, y una formulación de cápsula dura se prepararon, respectivamente, como se explica en los Ejemplos Comparativos 1 a 3, salvo que el microorganismo fue cambiado al microorganismo transformado de expresión de cólera de flagelina como se explica en el Ejemplo 2. Las membranas de la formulación de cápsula sin costuras obtenida, formulación de cápsula blanda, y la formulación de cápsulas duras no eran resistentes a los ácidos.

Ejemplos Comparativos 7 a 9

20 En los Ejemplos Comparativos 7 a 9, una formulación de cápsula sin costura, una formulación de cápsula blanda, y una formulación de cápsula dura se prepararon, respectivamente, como se explica en los Ejemplos Comparativos 1 a 3, excepto que el microorganismo se cambió a bacilo de la disentería de flagelina la que expresan microorganismo transformado preparado como se explicó en el Ejemplo 3. Las membranas de la formulación de cápsulas sin costuras obtenida, formulación de cápsula blanda, y la formulación de cápsulas duras no eran resistentes a los ácidos.

25 Ejemplo 4: El examen para la inducción de anticuerpos, resultando de la administración de microorganismo transformado de fiebre tifoidea de proteína de flagelina (Recombinante *B. animalis*)

30 En primer lugar, ratones hembras BALB/c de 8 a 12 semanas de edad (proporcionado por Charles River Laboratories Japan, Inc.) se adquirieron durante una semana con una dieta estándar. Los ratones se dividieron en nueve grupos (de 5 a 7 ratones por grupo). Durante tres grupos, la formulación de cápsula sin costura, la formulación de cápsula blanda, y la formulación cápsula dura, que se prepararon en el Ejemplo 1, se administró por vía oral por separado, cada uno de los cuales contenía el microorganismo transformado de expresión de fiebre tifoidea de flagelina. Para otros tres grupos, la formulación de cápsulas sin costuras no resistentes a los ácidos, la formulación de cápsulas blandas, y la formulación de cápsulas duras, que se prepararon en los Ejemplos Comparativos 1 a 3, respectivamente, se administra por vía oral por separado, cada uno de los cuales contenía el microorganismo transformado que expresa de fiebre tifoidea de flagelina. Para otro tres grupos, el microorganismo transformado de expresión de flagelina (recombinante *B. animalis*) células vivas, células vivas de hésped *B. animalis*, y un tampón de fosfato por separado, como controles. Estas formulaciones de cápsula, células vivas, y similares se ingiere una vez al día durante tres semanas.

45 Después de tres semanas, las cantidades de IgA en suero y heces se midieron como sigue. PBS que contiene antígeno de la flagelina se añadió a una placa de 96 pocillos (Nunc Immunoplate Maxisorb F96, fabricado por Nalge Nunc Internacional K.K.), y se mantuvo a 4°C durante 16 horas para revestimiento de la superficie de la placa. Posteriormente, el PBS que contiene 1 w / v% de albúmina de suero de bovino fue utilizada para el bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBS, se añadió un anticuerpo secundario (IgA, IgG, IgM anti-ratón derivado de cabra (fabricado por Santa Cruz Biotechnology, inc) y se incubó a temperatura ambiente durante tres horas. Después de lavar con PBS tres veces, se añadió un anticuerpo terciario (isotiocianato de fluoresceína (FITC) marcado con IgG de anti-cabra derivado de conejo (fabricado por QED Bioscience, Inc.), y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas. La fluorescencia se midió usando Fluoroscanner (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.). La Tabla 1 muestra los valores de fluorescencia resultantes.

Tabla 1

Muestra de administración	Número de BALB/c	Dosis diaria 10 ⁷ cfu/día	IgA en heces (OD±Std. Error)	IgA en suero (OD±Std. Error)
Ejemplo 1: cápsula sin costuras	7	2,5	0,16±0,012	0,40±0,145
Ejemplo 1: cápsula blanda	7	3,2	0,15±0,013	0,38±0,151

Ejemplo 1: cápsula dura	7	3	0,14±0,014	0,37±0,120
Ejemplo comparativo 1: cápsula sin costuras	5	2,5	0,05±0,011	0,16±0,038
Ejemplo comparativo 2: cápsula blanda	5	3,2	0,06±0,010	0,16±0,041
Ejemplo comparativo 3: cápsula dura	5	3	0,06±0,010	0,13±0,028
Células vivas de microorganismo transformado	5	2,5	0,04±0,012	0,11±0,041
Células vivas de microorganismo de huésped	5	12	0,02±0,008	0,10±0,038
Tampón de fosfato	5	-	0,02±0,006	0,14±0,032

Se observó que, en los casos de la cápsula sin costuras resistente a los ácidos, formulaciones de cápsula blanda y de cápsulas duras preparadas en el Ejemplo 1, independientemente de la forma de la formulación de cápsula resistente a los ácidos, las cantidades de IgA eran más grandes tanto en heces como en la sangre y el efecto de inducir un anticuerpo fue mayor, en comparación con los casos de las formulaciones de cápsulas no resistentes a los ácidos de los Ejemplos Comparativos 1 a 3 o de las células vivas.

Ejemplo 5: Examen para la inducción de anticuerpos resultantes de microorganismos transformados de administración de cólera de flagelina

La formulación de cápsulas sin costuras, la formulación de cápsula blanda, y la formulación cápsula dura, que se prepararon en el Ejemplo 2, y las formulaciones de cápsulas de los Ejemplos Comparativos 4 a 6 se examinaron para la inducción de anticuerpos como en el Ejemplo 4, cada uno de los cuales contenía el microorganismo transformado de cólera de flagelina que expresan células (recombinante *Lb. plantarum*).

Además, las células vivas del microorganismo transformado que expresa la cólera de flagelina, alberga células vivas de *Lb. plantarum*, y un tampón de fosfato que se utilizó para las administraciones de control. Tabla 2 muestra los resultados.

Tabla 2

Muestra de administración	Número de BALB/c	Dosis diaria 10 ⁷ cfu/día	IgA en heces (OD±Std. Error)	IgA en suero (OD±Std. Error)
Ejemplo 2: cápsula sin costuras	7	2,8	0,15±0,012	0,42±0,133
Ejemplo 2: cápsula blanda	7	3,3	0,13±0,013	0,41±0,142
Ejemplo 2: cápsula dura	7	3,2	0,13±0,014	0,39±0,140
Ejemplo comparativo 4: cápsula sin costuras	5	2,8	0,05±0,011	0,13±0,038
Ejemplo comparativo	5	3,3	0,06±0,010	0,12±0,052

5: cápsula blanda				
Ejemplo comparativo 6: cápsula dura	5	3,2	0,06±0,010	0,11±0,028
Células vivas de microorganismo transformado	5	2,8	0,03±0,012	0,12±0,032
Células vivas de microorganismo de huésped	5	8,3	0,02±0,008	0,10±0,022
Tampón de fosfato	5	-	0,02±0,006	0,15±0,033

Se observó que, en los casos de la cápsula sin costuras resistentes a los ácidos, formulaciones de cápsula blanda y de cápsula dura preparadas en el Ejemplo 2, independientemente de la forma de la formulación de cápsula resistente a los ácidos, las cantidades de IgA eran más grandes tanto en heces como en sangre y el efecto de inducir un anticuerpo fue mayor, en comparación con los casos de las formulaciones de cápsulas no resistentes a los ácidos de los Ejemplos Comparativos 4 a 6 o de las células vivas.

Ejemplo 6: Examen para la inducción de anticuerpos resultantes de los 10 Administración de disentería Flagelina-Expresando microorganismo transformado

La formulación sin fisuras cápsula, la formulación de cápsula blanda, y la formulación en cápsulas duras, que se prepararon en el Ejemplo 3, y las formulaciones de cápsulas de los Ejemplos Comparativos 7 a 9 se examinaron para la inducción de anticuerpos como en el Ejemplo 4, cada uno de los cuales contenía células de microorganismo transformado que expresa el bacilo de disentería de flagelina (recombinante *B. longum*).

Además, las células vivas de microorganismos transformados que expresa disentería de flagelina, las células vivas huésped *B. longum*, y un tampón de fosfato se utilizó para las administraciones de control. Tabla 3 muestra los resultados.

Tabla 3

Muestra de administración	Número de BALB/c	Dosis diaria 10 ⁷ cfu/día	IgA en heces (OD±Std. Error)	IgA en suero (OD±Std. Error)
Ejemplo 3: cápsula sin costuras	7	3,2	0,13±0,012	0,38±0,142
Ejemplo 3: cápsula blanda	7	3,9	0,12±0,013	0,37±0,153
Ejemplo 3: cápsula dura	7	4	0,13±0,014	0,39±0,131
Ejemplo comparativo 7: cápsula sin costuras	5	3,2	0,06±0,011	0,11±0,038
Ejemplo comparativo 8: cápsula blanda	5	3,9	0,05±0,010	0,12±0,051
Ejemplo comparativo 9: cápsula dura	5	4	0,06±0,010	0,11±0,028
Células vivas de microorganismo transformado	5	3,2	0,02±0,012	0,11±0,038

Células vivas de microorganismo de huésped	5	10,1	0,03±0,008	0,13±0,036
Tampón de fosfato	5	-	0,03±0,006	0,14±0,031

Se observó que, en los casos de la cápsula resistente a los ácidos sin costuras, formulaciones de cápsula blanda y de cápsulas dura preparadas en el Ejemplo 3, independientemente de la forma de la formulación de cápsula resistente a los ácidos, las cantidades de IgA eran más grandes tanto en heces como en sangre y el efecto de inducir un anticuerpo fue mayor, en comparación con los casos de las formulaciones de cápsulas no resistentes a los ácidos de los Ejemplos Comparativos 7 a 9 o de las células vivas.

Ejemplo 7: Preparación de la formulación de la cápsula resistente a los ácidos que contiene bifidobacterias que secretan antígeno de fiebre tifoidea fuera de la célula del microorganismo

A. La amplificación del gen de Flagelina *S. Typhimurium* mediante PCR

El fragmento de gen de flagelina *S. typhimurium* se preparó como en la Sección A del Ejemplo 1.

B. La amplificación de ADN del péptido señal de secreción a través de PCR

B. bifidum ATCC 29521 fue cultivado en medio MRS (fabricado por Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.) a 37 ° C durante 12 horas. Después de finalizado el cultivo, el ADN genómico (Access#AJ224435) de *B. bifidum* se extrae convencionalmente. El PCR se realizó como en la Sección A del Ejemplo 1, usando el ADN genómico de *B. bifidum* como una plantilla con par de cebadores de SEQ ID NO: 11 (hacia delante): 5'CGGCAAGCTTTATGGGGGATACAGGATTGGCGAT-3' (AAGCTT en las posiciones 5 a 10 es el sitio de escisión de HindIII) y SEQ ID NO: 12 (atrás): 5'-GCGCCCATGGAAATCGGGTGGCGTCCTCGACCG-3'(CCATGG en las posiciones 5 a 10 es el sitio de escisión NcoI). Después de la finalización de la PCR, el producto resultante se escindió con NcoI y HindIII. Por lo tanto, el fragmento de gen del péptido señal de secreción se preparó.

C. Preparación del vector de expresión de tipo secreción

El plásmido pBLES100 se escindió con BamHI y HindIII y se combina con y se ligó al fragmento del gen de flagelina obtenido en la sección A que se ha descrito anteriormente y el fragmento de gen del péptido señal de secreción obtenido en la Sección B descrita anteriormente. De este modo, se obtuvo un vector pBLES-SP-FliC de expresión del tipo de secreción.

D. Introducción de vector de expresión de tipo de secreción en *B. breve*

La transformación se realizó como en la Sección D del Ejemplo 1, salvo que el pBLES-SP-F1iC obtenido en la Sección C descrito anteriormente se utilizó como vector de expresión, y *B. breve* ATCC 15700 se utilizó como el microorganismo a ser transformado. Por lo tanto, *B. breve* transformado se obtuvo.

E. La confirmación de la secreción

El *B. breve* transformado obtenido en la sección D descrito anteriormente se cultivó en medio de caldo MRS que contiene mármol a 37 ° C durante 12 horas, y posteriormente, se centrifugó a 4 ° C y 12.000 rpm, y se obtuvo el sobrenadante. El sobrenadante se sometió a Western Blotting como en la Sección E del Ejemplo 1. Se confirmó que una proteína de flagelina fue secretada fuera de las células de *B. breve* transformado.

F. Preparación de un microorganismo en polvo liofilizado del microorganismo transformado

El *B. breve* confirmado para la secreción de flagelina de fiebre tifoidea se confirmó que fue utilizado para preparar polvos de células de microorganismos liofilizados como en la sección F del Ejemplo 1.

G. La preparación de formulación de cápsulas sin costuras resistentes a los ácidos, formulación de cápsula blanda y formulación de cápsula dura.

Con los polvos de microorganismos liofilizados obtenidos como se explica en la Sección F descritos anteriormente, una formulación de cápsula sin costuras, una formulación de cápsula blanda, y una formulación de cápsula dura se prepararon como en las secciones G, H y I del Ejemplo 1, respectivamente. Las membranas de la formulación de cápsula sin costuras obtenida, formulación de cápsula blanda, y la formulación de cápsula dura resistentes a los ácidos.

Ejemplos Comparativos 10 a 12

En los Ejemplos Comparativos 10 a 12, una formulación de cápsula sin costuras, una formulación de cápsula blanda, y una formulación de cápsula dura se prepararon, respectivamente, como en los Ejemplos Comparativos 1 a 3, excepto que el microorganismo se cambió al microorganismo transformado de expresión de la fiebre tifoidea de secreción de flagelina preparado como en el Ejemplo 7. Las membranas de la formulación de cápsulas sin costuras obtenida, la formulación de cápsula blanda y de formulación de cápsula dura no eran resistentes a los ácidos.

Ejemplo 8

La formulación de cápsulas sin costuras, la formulación de cápsulas blandas y la formulación de cápsulas duras, que se obtuvieron en el Ejemplo 7, y las formulaciones de cápsulas de los Ejemplos Comparativos 10 al 12 fueron examinadas para la inducción de anticuerpos como en el Ejemplo 4, cada una de las cuales contenía las células de microorganismo transformado de fiebre tifoidea secretor de flagelina (recombinante *B. breve*).

Por otra parte, las células vivas de expresión de microorganismo transformado de fiebre tifoidea de secreción de flagelina (recombinante *B. breve*), células vivas de *B. breve* de huésped, y un tampón de fosfato se utilizó para el control de administraciones. La tabla 4 muestra los resultados.

Tabla 4

Muestra de administración	Número de BALB/c	Dosis diaria 10 ⁷ cfu/día	IgA en heces (OD±Std. Error)	IgA en suero (OD±Std. Error)
Ejemplo 7: cápsula sin costuras	7	3,5	0,18±0,015	0,44±0,155
Ejemplo 7: cápsula blanda	7	4,1	0,16±0,013	0,42±0,148
Ejemplo 7: cápsula dura	7	3,6	0,20±0,014	0,38±0,140
Ejemplo comparativo 10: cápsula sin costuras	5	3,5	0,05±0,012	0,12±0,033
Ejemplo comparativo 11: cápsula blanda	5	4,1	0,04±0,011	0,11±0,046
Ejemplo comparativo 12: cápsula dura	5	3,6	0,06±0,013	0,14±0,034
Células vivas de microorganismo transformado	5	3,4	0,05±0,011	0,13±0,036
Células vivas de microorganismo de huésped	5	10,5	0,03±0,009	0,12±0,039
Tampón de fosfato	5	-	0,02±0,007	0,13±0,040

Se observó que, en los casos de la cápsula sin costuras resistente a los ácidos, formulaciones de cápsula blanda y de cápsula dura que contienen el microorganismo transformado que expresa la fiebre tifoidea de secreción de flagelina preparado en el Ejemplo 7, independientemente de la forma de formulación de cápsula resistente a los ácidos, las cantidades de IgA eran más grandes tanto en heces como en sangre y el efecto de inducir un anticuerpo fue mayor, en comparación con los casos de las formulaciones de cápsulas no resistentes a los ácidos de los Ejemplos Comparativos 10 a 12 o de las células vivas.

Aplicabilidad Industrial

Una formulación en la que un microorganismo transformado que expresa la flagelina está contenida en una cápsula resistente al ácido aumenta la cantidad de anticuerpo anti-flagelina producido, y por lo tanto es eficaz como una vacuna oral contra una enfermedad infecciosa bacteriana, como la fiebre tifoidea, el cólera o la disentería. Por lo tanto, un método para prevenir y tratar enfermedades infecciosas bacterianas puede proporcionarse. En consideración de las últimas bacterias patógenas infecciosas resistentes a los medicamentos prevalentes, la administración de una vacuna oral a personas que viven en una zona endémica o personas que visitan una región de negocios o de vacaciones es una estrategia ideal para la prevención y el tratamiento.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Morishita Jintan Co., Ltd.
- <120> Vacuna Oral
- <130> P39591EP
- <150> JP 2007-70626
- <151> 2007-03-19
- <160> 12
- <170> PatentIn versión 3,1
- <210> 1
- <211 > 30
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador directo de salmonella typhimurium
- <400> 1
- catgcatgg atggcacagt cattaataca 30
- <210> 2
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- < 223> Cebador inverso salmonella typhimurium
- <400> 2
- cgcgatcct taacgcagta aegagaggac 30
- <210> 3
- <211> 31
- <212> ADN
- <213> Artificial

ES 2 563 242 T3

<220>
 <223> cebador directo vibrio cholerae
 5 <400> 3
 catgcatgg atggcaatta atgtaaacac g 31
 <210> 4
 10 <211> 31
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso vibrio cholerae
 20 <400> 4
 cgcgatcct ttatccaat aagctcagag c 31
 25 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> cebador directo shigella dysenteriae
 <400> 5
 catgcatgg atggcacaag tcattaatac 30
 40 <210> 6
 <211> 30
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> cebador inverso shigella dysenteriae
 <400> 6
 55 cgcgatcct ttaacctgc tgcagagaca 30
 <210> 7
 <211> 30
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

ES 2 563 242 T3

```

<223> cebador directo hup
<400> 7
5      cgccaagctt tggcgcggc ggccatgaag      30
<210> 8
<211> 30
10     <212> ADN
<213> Artificial
15     <220>
<223> cebador inverso hup
<400> 8
20     cgcgccatgg aaagcatcct tctgggtca      30
<210> 9
25     <211> 600
<212> ADN
<213> Bifidobacterium longum
30     <220>
<221> promotor
35     <222> (1)..(192)
<223>
<220>
40     <221> CDS
<222> (193)..(474)
45     <223>
<220>
<221> terminador
50     <222> (475) .. (600)
<223>
55     <400> 9
      tggcgcggc ggccatgaag tggctgaca agcataatct tgtctgattc, gtctatttc      60
      atacccccct cggggaata gatgtgaaa ccctataaa acgcggtt tcgcagaaac      120
60     atgcgctagt atcattgatg acaacatgga ctaagcaaaa gtgctgtcc cctgacccaa      180
      gaaggatgct tt atg gca tac aac aag tct gac ctc gtt tcg aag atc gcc      231
65     Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Lys Ile Ala.
          1                    5

```

ES 2 563 242 T3

cag aag tcc aac ctg acc aag gct cag gcc gct gag gtt gct gcc aac 279
 Gln Lys Ser Asn Thr Leu Lys Ala Gln Ala Glu Ala Ala Val Asn Ala
 15 20 25
 5 ttc cag gat gtg ttc gtc gag gct atg aag tcc ggc gaa ggc ctg aag 327
 Phe Gln Asp Val Phe Val Glu Ala Met Lys Ser Gly Glu Gly Leu Lys 45
 30 35 40
 10 ctc acc ggc ctg ttc tcc gct gag cgc gtc aag cgc ccg gct cgc acc 375
 Leu Thr Gly Leu Phe Ser Ala Glu Arg Val Lys Arg Pro Ala Arg Thr
 50 55 60
 15 ggc cgc aac ccg cgc act ggc gag cag att gac att ccg gct tcc tac 423
 Gly Arg Asn Pro Arg Thr Gly Glu Gln Ile Asp Ile Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75
 20 ggc gtt cgt atc tcc gct ggc tcc ctg ctg aag aag gcc gtc acc gag 471
 Gly Val Arg Ile Ser Ala Gly Ser Leu Leu Lys Lys Ala Val Thr Glu
 80 85 90
 25 tga ccttctgctc gtagcgatta cttcgagcat tactgacgac aaagaccccg 524
 accgagatgg tcggggctct ttgtgtgg tgctgtgacg tgtgtccaa ccgtattatt 584
 30 ccggactagt tcagcg 600
 <210> 10
 <211> 93
 35 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium longum
 40 <400> 10
 Met Ala Tyr Asp Lys Asp Ser Leu Val Ser Lys Ile Ala Gln Lys Ser 15
 1 5 10
 45 Asn Leu Thr Lys Ala Gln Ala Glu Ala Ala Val Asn Ala Phe Gln Asp 30
 20 25
 Val Phe Val Glu Ala Met Lys Ser Gly Glu Gly Leu Lys Leu Thr Gly 45
 35 40
 50 Leu Phe Ser Ala Glu Arg Val Lys Arg Pro Ala Arg Thr Gly Arg Asn 60
 50 55 60
 55 Pro Arg Thr Gly Glu Gln Ile Asp Ile Pro Ala Ser Tyr Gly Val Arg 80
 65 70 75
 Ile Ser Ala Gly Ser Leu Leu Lys Lys Ala Val Thr Glu 90
 85 90
 60 <210> 11
 <211> 34
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 563 242 T3

<220>

<223> Cebador directo bifidobacterium bifidum

5 <400> 11

cgccaagctt tatgggggat acaggattgg cgat 34

<210> 12

10

<211> 33

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso bifidobacterium bifidum

20

<400> 12

gcgcccatgg aaatcgggtg gcgtcctcga ccg 33

25

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna oral contra una enfermedad infecciosa bacteriana, en la forma de una formulación de cápsula, que comprende:
- 5 una membrana de la cápsula y un microorganismo transformado que expresa una proteína de antígeno de flagelina, en el que la membrana de la cápsula es resistente a los ácidos, y el microorganismo transformado se encapsula con la membrana de la cápsula.
- 10 2. La vacuna oral de la reivindicación 1, en la que la proteína de antígeno de flagelina se expresa en la célula del microorganismo.
- 15 3. La vacuna oral de la reivindicación 1, en la que la proteína de antígeno de flagelina se secreta fuera de la célula del microorganismo.
- 20 4. La vacuna oral de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el microorganismo es al menos uno seleccionado a partir de microorganismos pertenecientes al grupo que consta del género *Bifidobacterium*, el género *Lactobacillus*, el género *Lactococcus*, el género *Pediococcus*, el género *Streptococcus*, el género *Enterococcus*, el género *Leuconostoc*, el género *Tetragenococcus*, el género *Oenococcus*, y el género *Weissella*.
- 25 5. La vacuna oral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la vacuna oral es una vacuna contra la fiebre tifoidea, el cólera, o la disentería.
- 30 6. La vacuna oral de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la formulación de la cápsula es una formulación de cápsula sin costuras, una formulación de cápsula blanda, o una formulación de cápsula dura.
- 35 7. Un método para producir una vacuna oral contra una enfermedad infecciosa bacteriana, que comprende las etapas de la preparación de un microorganismo transformado que expresa una proteína de antígeno de ; y que envuelve el microorganismo transformado en una membrana de la cápsula resistente a los ácidos, produciendo de este modo una formulación de cápsula resistente a los ácidos
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que el microorganismo transformado secreta la proteína de antígeno de flagelina en la célula del microorganismo.
- 45 9. El método de la reivindicación 7, en el que el microorganismo transformado secreta la proteína de antígeno de flagelina fuera de la célula del microorganismo.
- 50 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que el microorganismo es al menos uno seleccionado a partir de microorganismos pertenecientes al grupo que consta del género *Bifidobacterium*, el género *Lactobacillus*, al género *Lactococcus*, el género *Pediococcus*, el género *Streptococcus*, el género *Enterococcus*, el género *Leuconostoc*, el género *Tetragenococcus*, el género *Oenococcus* , y el género *Weissella*.
- 55 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la vacuna oral es una vacuna contra la fiebre tifoidea, el cólera, o disentería.
- 60 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la formulación de cápsulas es una formulación de cápsula sin costura, una formulación de cápsula blanda, o una formulación de cápsula dura.
- 65 13. Un método para producir una vacuna oral frente a una enfermedad infecciosa bacteriana, que comprende las etapas de:
preparar un microorganismo transformado que expresa una proteína de antígeno de flagelina;
envolver el microorganismo transformado en una membrana de cápsula, produciendo de este modo una formulación de cápsula; y
proporcionar la membrana de cápsula de la formulación en cápsulas producida con resistencia a los ácidos.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el microorganismo transformado expresa la proteína de antígeno de flagelina en la célula del microorganismo.
15. El método de la reivindicación 13, en el que el microorganismo transformado secreta la proteína de antígeno de flagelina fuera de la célula del microorganismo.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el microorganismo es al menos uno seleccionado a partir de microorganismos pertenecientes al grupo que consta del género *Bifidobacterium*, el género *Lactobacillus*, al género *Lactococcus*, el género *Pediococcus*, el género *Streptococcus*, el género *Enterococcus*, el género *Leuconostoc*, el género *Tetragenococcus*, el género *Oenococcus*, y el género *Weissella*.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que la vacuna oral es una vacuna contra la fiebre tifoidea, el cólera, o disentería.

- 5 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que la formulación de cápsulas es una formulación de cápsula sin costura, una formulación de cápsula blanda, o una formulación de cápsula dura.

10

Fig. 1

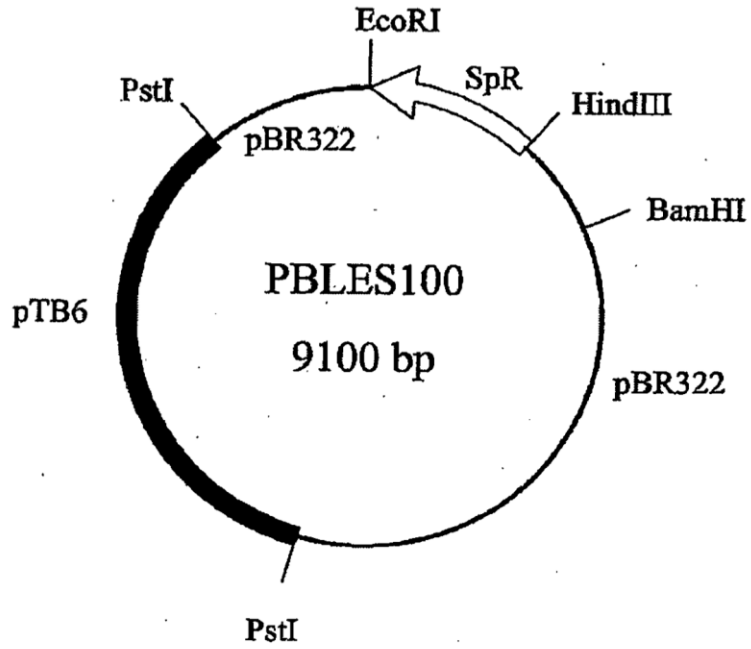


Fig. 2

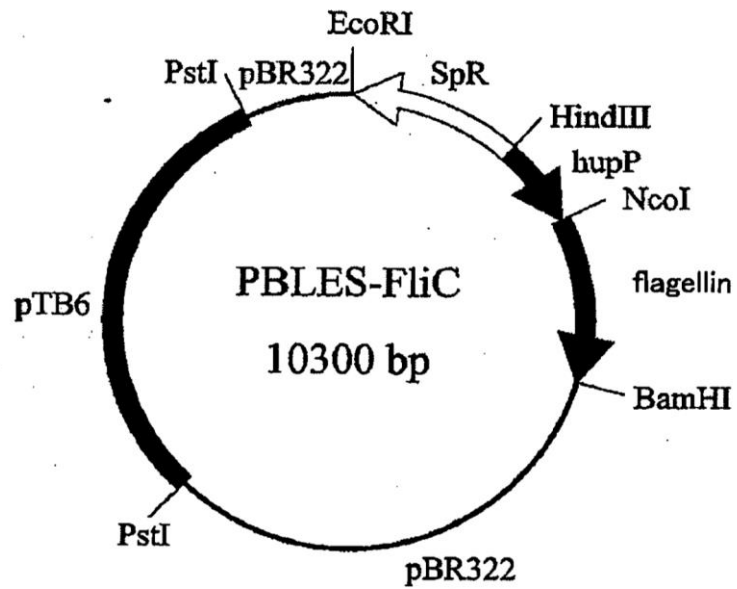


Fig. 3

