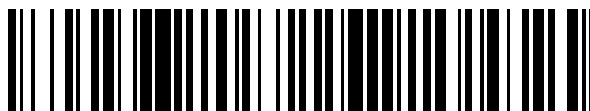


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 018**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2013 E 13001690 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2647387**

54 Título: **Composición de vacuna**

30 Prioridad:

04.04.2012 JP 2012085839

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

27.04.2016

73 Titular/es:

**NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)
1-2, Shimohozumi 1-chome, Ibaraki-shi
Osaka 567-8680, JP**

72 Inventor/es:

**FUKASAKA, MASAHIRO;
OKAZAKI, ARIMICHI;
ASARI, DAISUKE;
HORI, MITSUHIKO;
AKIRA, SHIZUO y
TAKEUCHI, OSAMU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 568 018 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

Composición de vacuna

La presente invención se refiere a una composición de vacuna que puede administrarse por vía sublingual, útil para ser un agente preventivo o terapéutico para enfermedades infecciosas. La presente invención se refiere en particular a una composición de vacuna para ser usada en medicina, en donde la composición de vacuna se ha de administrar a la mucosa de la cavidad oral de una persona o un animal, comprendiendo la composición de vacuna:

al menos un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa, y

al menos un elemento seleccionado entre el grupo consistente en:

un agonista del receptor 4 de tipo toll (TLR4: Toll-Like Receptor 4),

en donde el agonista del receptor 4 de tipo toll comprende al menos un elemento elegido entre el grupo consistente en un lipopolisacárido o una sal del mismo,

en donde el lipopolisacárido o la sal del mismo se deriva de *Pantoea*, *Acetobacter*, *Zymomonas*, *Xanthomonas* o *Enterobacter*.

Actualmente, los preparados de vacunas comerciales son disponibles en su mayoría en forma de inyección. La vacuna en forma de inyección induce la respuesta inmunitaria (producción de anticuerpo IgG) en la sangre (sistémica) pero no induce la respuesta inmunitaria mucosal (la producción de anticuerpos IgA), y por lo tanto previene el crecimiento de patógenos posterior a la infección, pero tiene un problema en la protección frente a la infección por patógenos por vía mucosal.

Bajo estas circunstancias, la vacunación por vía mucosal ha llamado la atención en los últimos años. En particular, ha alcanzado notoriedad el desarrollo de una vacuna que contiene un virus de la gripe como antígeno para la administración mucosal (administración transnasal).

La vacuna para administración mucosal induce la inmunidad sistémica (producción de anticuerpos IgG) y también induce la inmunidad mucosal (producción de anticuerpo IgA). El anticuerpo IgA no discrimina estrictamente el tipo de patógeno de una enfermedad a la que se dirige, es adaptable a la epidemia de patógenos cambiantes cada año y así pues se considera que es eficaz para la prevención pandémica.

Una de las razones para que la vacuna de administración transnasal atraiga la atención es que la administración del antígeno a la mucosa gastrointestinal es susceptible a las influencias del jugo gástrico y proteasas que son difícilmente evitables, mientras que la administración del antígeno a la mucosa transnasal está libre de estas influencias. Además, hay un tejido de reconocimiento del antígeno llamado NALT en la mucosa de la cavidad nasal que es beneficioso para la respuesta inmunitaria. Esta es otra razón para que cobre interés la vacuna de administración transnasal.

Sin embargo, la administración del antígeno a la mucosa de la cavidad nasal, aun siendo muy eficaz, ha tenido inconvenientes en cuanto a que lo más probable es que produzca efectos adversos críticos, tales como la encefalopatía aguda, o similares; la administración transnasal es engorrosa *per se* y difícil de practicar en personas de edad avanzada, bebés, o similares, y no está asegurado un efecto estable debido a factores físicos tales como el moco nasal, o similares.

Por otra parte, también ha habido muchos intentos de inducir la inmunidad sistémica y la inmunidad mucosal mediante la administración oral de un antígeno a través de la mucosa gastrointestinal (intestino), y similares, después de tragar. El problema aquí es cómo evitar la descomposición del antígeno provocada por el jugo gástrico o las proteasas. Para resolver el problema, se han desarrollado técnicas para neutralizar el jugo gástrico mediante un gran contenido de un antiácido, o para proteger un antígeno usando técnicas de recubrimiento tales como microesferas, o similares.

Sin embargo, el desarrollo tuvo éxito prácticamente sólo en vacunas intrínsecamente muy estables en el jugo gástrico, tales como la vacuna de poliovirus atenuado vivo y en la vacuna del rotavirus atenuado vivo.

Alternativamente, una vacuna para la alergia es un ejemplo de preparado para administración oral para inducir una respuesta inmunitaria por medio del suministro a la mucosa de la cavidad oral (particularmente la mucosa sublingual) sin tragar. Esta vacuna se denomina como inmunoterapia sublingual (SLIT: SubLingual ImmunoTherapy) y actúa mediante la continuada administración por vía sublingual de un extracto de origen vegetal que contiene una proteína que va a ser un antígeno de alergia (alérgeno) para impulsar la inmunotolerancia contra el alérgeno y reducir la reacción alérgica. En los últimos años, la SLIT es ampliamente aceptada en Europa y actualmente hay muchos productos disponibles en el mercado.

La terapia usando un preparado tal que induce la respuesta inmunitaria a través de la vía de la mucosa de la cavidad oral, en particular la vía de la mucosa sublingual, es el foco de atención porque proporciona una mejor calidad de

vida del paciente y tiene un riesgo de choque anafiláctico, efecto adverso crítico, más bajo que la terapia convencional que requería la inyección subcutánea de un alérgeno (inmunoterapia subcutánea).

5 Sin embargo, la SLIT ha sido para usar preparados sólo para impulsar una inmunotolerancia específica, pero no ha sido una terapia para activar la inmunidad. Generalmente no es probable que la mucosa de la cavidad oral desarrolle la inmunidad, y se ha considerado que la activación de la inmunidad, incluso si se desarrolla inmunotolerancia, es difícil.

Se exponen ejemplos de la inducción de la inmunidad mucosal y de la inmunidad sistémica por medio de la vía de la mucosa de la cavidad oral, en particular la vía de la mucosa sublingual, incluyendo lo siguiente.

10 Se ha propuesto que la respuesta inmunitaria sistémica específica de OVA (producción de IgG) y la respuesta inmunitaria mucosal específica de OVA (producción de IgA) se han confirmado cuando se han administrado por vía sublingual OVA usada como antígeno y toxina del cólera usada como adyuvante (véase, por ejemplo, la Bibliografía de Patentes 1). Sin embargo, en la propuesta, se usó toxina del cólera altamente neurotóxica como coadyuvante y se dejó aclarar la cuestión de seguridad.

15 Se ha propuesto que el uso de OVA como antígeno y 3 monofosforil lípido A des-O-acilado, un agonista de TLR4, como adyuvante y su administración sublingual ocasiona respuesta inmunitaria sistémica específica de OVA (producción de IgG) y respuesta inmunitaria mucosal específica de OVA (producción de IgA) también (véase, por ejemplo, la Bibliografía de Patentes 2). En esta propuesta, un agonista de TLR4 fue administrado por vía sublingual como coadyuvante, si bien no se presentó ningún ejemplo en relación con un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa y no fue evidente la versatilidad del efecto con el tipo de antígeno. Además, siendo las dosis de OVA comparativamente grandes de 80 a 160 µg y siendo el monofosforil lípido A 3 des-O-acilado de 20 a 40 µg, no son prácticas cuando se considera la seguridad.

25 Una propuesta sobre un método para sintetizar glucopiranosil lípidos, un coadyuvante sintético (véase por ejemplo la Bibliografía de Patentes 3), describe también la inducción de respuesta inmunitaria mucosal mediante la administración mucosal de un antígeno en combinación con el coadyuvante. También son propuestas las inducciones de IgG e IgA en el suero en un lavado nasal mediante la administración de MALP-2, un ligando de TLR2/6, junto con β-galactosidasa usada como antígeno en la cavidad nasal de un ratón (véase, por ejemplo, Bibliografía de Patentes 4). Sin embargo, no se presentó ningún ejemplo relativo a un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa o de su administración a la mucosa de la cavidad oral, y por tanto no fue evidente la versatilidad del efecto. El uso de c-di-GMP o c-di-AMP, dinucleótido cíclico, como coadyuvante junto con β-galactosidasa como antígeno y su administración por vía intranasal a un ratón han sido también propuesto para provocar la inducción de IgG en el suero (véase, por ejemplo, la Bibliografía de Patentes 5), si bien la propuesta no menciona la inducción de IgA por medio de la administración transnasal y no se presentó ningún ejemplo relativo a un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa o de su administración a la mucosa de la cavidad oral, y por tanto no fue evidente la versatilidad del efecto.

35 Lista de citas.

Bibliografía de Patentes.

Bibliografía de Patentes 1: Solicitud de Patente de EE.UU. N° de serie 2008/0112974.

Bibliografía de Patentes 2: Documento JP 2003-519669 T.

Bibliografía de Patentes 3: Solicitud de Patente de EE.UU. N° de serie 2010/0310602.

40 Bibliografía de Patentes 4: Solicitud de Patente de EE.UU. N° de serie 2005/0276813.

Bibliografía de Patentes 5: Solicitud de Patente de EE.UU. N° de serie 2008/0286296.

45 En este contexto, el documento WO 2011/151431 A1 describe vacunas orales que comprenden un antígeno y receptor de tipo toll (TLR). Además, el documento WO 94/20070 A1 describe una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmunitaria frente a un agente infeccioso en un animal, que comprende un antígeno, un mucoadhesivo y un LPS de *E. coli*.

Bajo las actuales circunstancias descritas anteriormente, la presente invención tiene el objeto de proporcionar una composición de vacuna que es administrable en la mucosa de la cavidad oral, útil para que sea un agente preventivo o terapéutico para enfermedades infecciosas, e induce eficazmente una respuesta inmunitaria sistémica o una respuesta inmunitaria mucosal.

50 Los presentes inventores llevaron a cabo amplios estudios para resolver el problema anterior y encontraron que se induce eficazmente una respuesta inmunitaria sistémica y una respuesta inmunitaria mucosal cuando al menos un elemento elegido entre el grupo que consiste en un agonista del receptor 4 de tipo toll (TLR4), en donde el agonista del receptor 4 de tipo toll comprende al menos un elemento elegido entre el grupo que consiste en lipopolisacárido o una sal del mismo, en donde el lipopolisacárido o la sal del mismo se deriva de *Pantoea*, *Acetobacter*, *Zymomonas*,

Xanthomonas o *Enterobacter*, es administrado a la mucosa oral, en particular administrado sublingualmente, como coadyuvante junto con un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa, con lo que fue realizada la presente invención.

5 Más concretamente, la presente invención se refiere a una composición de vacuna para su uso en medicina, en donde la composición de vacuna se ha de administrar a la mucosa de la cavidad oral de una persona o un animal, comprendiendo la composición de vacuna:

10 al menos un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa, y al menos un elemento elegido entre el grupo consistente en un agonista del receptor 4 de tipo toll (TLR4), en donde el agonista del receptor 4 de tipo toll (TLR4) comprende al menos un elemento elegido entre el grupo consistente en un lipopolisacárido o una sal del mismo,

en donde el lipopolisacárido o la sal del mismo se deriva de *Pantoea*, *Acetobacter*, *Zymomonas*, *Xanthomonas* o *Enterobacter*.

En la composición de vacuna de la presente invención, el antígeno derivado de una enfermedad infecciosa es preferiblemente un antígeno derivado del virus de la gripe.

15 El antígeno derivado del virus de la gripe es preferentemente la proteína hemaglutinina.

El antígeno derivado del virus de la gripe es preferiblemente un virus completo inactivado.

El agonista del receptor 4 de tipo toll (TLR4) comprende al menos un elemento elegido entre el grupo que consistente en un lipopolisacárido o una sal del mismo.

20 El lipopolisacárido o la sal del mismo se deriva preferiblemente de *Pantoea*, *Acetobacterium*, *Zymomonas*, *Xanthomonas* o *Enterobacter*.

En la composición de vacuna de la presente invención, la administración a la mucosa de la cavidad oral es preferiblemente la administración a la mucosa sublingual.

25 La composición de vacuna de la presente invención induce preferiblemente una respuesta inmunitaria de la mucosa y una respuesta inmunitaria sistémica, y la respuesta inmunitaria mucosal y una respuesta inmunitaria sistémica y la respuesta inmunitaria mucosal es la producción de anticuerpo IgA específica del antígeno, y la respuesta inmunitaria sistémica es la producción de anticuerpo IgG específica del antígeno.

En adelante, la presente invención se describe con detalle.

La composición de vacuna de la presente invención contiene al menos un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa.

30 El antígeno anterior derivado de una enfermedad infecciosa se refiere a cualquier sustancia dirigida por la respuesta inmunitaria desarrollada en un organismo de prueba. El antígeno anterior derivado de una enfermedad infecciosa puede también ser la diana de la respuesta inmunitaria (por ejemplo, el envejecimiento de las células inmunocompetentes, la producción de citocinas, la producción de anticuerpos, etc.) en el contacto con la célula inmunocompetente.

35 El antígeno derivado de una enfermedad infecciosa usado en la presente invención no está limitado por cuanto un antígeno es un agente patógeno infeccioso o deriva de un agente patógeno infeccioso.

40 La enfermedad desarrollada por el agente patógeno infeccioso anterior no está limitada y los ejemplos incluyen enfermedades virales causadas por la infección de virus tales como adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, HSV-I, HSV-II, CMV o VZV), virus de la viruela (por ejemplo, de la viruela o vacuna, u ortopoxvirus, tales como el molusco contagioso, o similares), picornavirus (por ejemplo rinovirus o enterovirus), ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), virus paramixo (por ejemplo, virus de la parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio (RSV)), virus corona (por ejemplo, SARS), papovavirus (por ejemplo, virus del papiloma que causa verrugas genitales, verrugas comunes o verrugas plantares), hepadnavirus (por ejemplo, virus de la hepatitis B), flavivirus (por ejemplo, virus de la hepatitis C o virus del dengue), o retrovirus (por ejemplo, lentivirus tales como VIH, o similares), y similares; enfermedades bacterianas causadas por la infección de bacterias tales como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Listeria*, *Aerobacter*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Chlamydiaceae*, *Mycoplasma*, *Neumococos*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Campyrobacter*, *Vibrión*, *Serratia*, *Providencia*, *Chromobacterium*, *Brucella*, *Yersinia*, *Haemophilus*, o *Bordetella*, y similares; enfermedades fúngicas como la *Chlamydia*, *Candidiasis*, *Aspergillosis*, *Histoplasmosis*, meningitis criptocócica, para empezar con, pero sin limitarse a ellas; *Malaria*, neumonía por *Pneumocystis carinii*, Leishmaniasis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis, infección por Trypanosoma, y similares.

45

50

En la presente invención, el antígeno derivado de una enfermedad infecciosa es preferiblemente un antígeno derivado del virus de la gripe.

El virus de la gripe usado aquí se refiere a un virus RNA con envoltura que pertenece a *Orthomyxoviridae* y que tiene un tamaño con un diámetro de partícula de aproximadamente 100 nm, y está clasificado en los tipos A, B y C basándose en la antigenicidad de su proteína interna. El virus de la gripe está compuesto por un núcleo de una nucleocápsida interna rodeado por una envoltura de virus que tiene una estructura de bicapa lipídica o de ácido ribonucleico (RNA) asociado a una nucleoproteína, y una glicoproteína externa. La capa interna de la envoltura del virus anterior está constituida principalmente por proteínas de la matriz y la capa externa está constituida en su mayor parte por materiales lipídicos derivados de una célula hospedadora. El RNA del virus de la gripe tiene una estructura segmentaria. Adicionalmente, las pandemias mundiales de gripe son causadas por el virus de la gripe de tipo A. El virus de la gripe de tipo A tiene 2 tipos de glicoproteínas de envoltura, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), y, basándose en el tipo de antígeno, la HA se clasifica en 16 subtipos y la NA en 9 subtipos.

En la presente invención, los antígenos derivados de virus de la gripe Tipos A y B se utilizan preferiblemente para que sean el antígeno anterior derivado de una enfermedad infecciosa. El subtipo de los virus de la gripe de tipo A y de tipo B descrito anteriormente no es limitado, y puede ser cualquiera de los subtipos aislados hasta ahora o subtipos que vayan a ser aislados en un futuro.

En la presente invención, el antígeno derivado del virus de la gripe no está limitado por cuanto es al menos parte de los muchos componentes que componen los virus de la gripe anteriores. Los ejemplos incluyen un virus completo inactivado en el que una partícula de virus purificada es inactivada con un disolvente/agente tensioactivo orgánico u otros reactivos, o una subunidad de virus preparado eliminando impurezas del virus completo inactivado y purificando la HA y/o NA, y similares. La subunidad HA o virus completo inactivado es preferible en cuanto a la inmunogenicidad. El virus completo inactivado se inactiva preferiblemente usando formalina, o similares. La subunidad HA (split), que tiene muy pocas impurezas y que requiere un adyuvante, es particularmente eficaz.

El método de preparar el antígeno de virus de la gripe no está limitado y se usa sin limitación cualquier método conocido. Los ejemplos incluyen un método en el que se hace que una cepa de virus aislado de un animal infectado con gripe o un paciente con gripe infecte un huevo de gallina, o similares, y se incuba de forma rutinaria, preparando así un antígeno a partir de la solución de virus sin diluir purificada. Alternativamente, también puede usarse un antígeno derivado de un virus preparado en células de cultivo utilizando una técnica de ingeniería genética.

La composición de vacuna para uso de acuerdo con la presente invención puede contener el antígeno derivado de una enfermedad infecciosa en una cantidad eficaz, pero preferiblemente la contiene en una cantidad, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1.000 µg a la cantidad total de la misma por individuo y por administración. La cantidad es más preferiblemente de 0,01 a 100 µg y aún más preferiblemente de 0,1 a 50 µg. Una cantidad inferior a 0,001 µg puede dar lugar a una función insuficiente para que sea un agente preventivo o terapéutico para enfermedades infecciosas, mientras que una cantidad superior a 1.000 µg puede plantear un problema de seguridad. Además, el término "por individuo" se refiere a cualquier mamífero, y se prefiere un ser humano.

La composición de vacuna para uso de acuerdo con la presente invención contiene al menos un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en un agonista del receptor 4 de tipo toll (TLR4), o una sal del mismo.

Estos compuestos sirven como adyuvantes en la composición de vacuna de la presente invención.

El agonista del receptor 4 de tipo toll (TLR4) es un lipopolisacárido, o una sal del mismo. El término "sal" se refiere a cualquier sal de ácido orgánico y se prefiere una sal aceptable farmacéuticamente.

El lipopolisacárido puede ser un extracto de la pared celular de bacterias gram-negativas o un producto modificado del mismo, o un producto sintético.

Los ejemplos de bacterias gram-negativas incluyen *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Acetobacter* sp., *Xanthomonas* sp., *Zymomonas* sp., y similares.

Las bacterias gram-negativas preferibles entre ellas son las derivadas de *Pantoea* sp., *Acetobacter* sp., *Zymomonas* sp., *Xanthomonas* sp. o *Enterobacter* sp. Estas bacterias han sido usadas en muchos productos alimentarios y en medicina herbaria durante muchos años, y está garantizada la seguridad en organismos vivos. Las bacterias *Pantoea*, en particular, se usan actualmente como productos alimentarios sanos y aseguran más eficacia. Los extractos derivados de estas bacterias o productos modificados de las mismas pueden usarse también sin más tratamiento.

Cuando el lipopolisacárido se usa en forma de extracto a partir de la pared celular de las anteriores bacterias gram-negativas o un lipopolisacárido purificado, generalmente se ha de considerar la seguridad en el organismo vivo y también puede usarse un producto modificado con el fin de desintoxicarlo. Por otra parte, en muchos productos alimentarios y en medicina herbaria se han usado durante muchos años *Acetobacter* sp. (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter orientalis*, o similares), *Zymomonas* sp. (*Zymomonas mobilis* o similares), *Xanthomonas* sp. (*Xanthomonas campestris* o similares), *Enterobacter* sp. (*Enterobacter cloacae* o similares), y

Pantoea sp. (*Pantoea agglomerans*, o similares). Los extractos derivados de estas bacterias o lipopolisacárido purificado se pueden también usar sin más tratamiento.

5 Los agonistas de TLR4 anteriores funcionan suficientemente cada uno de ellos como coadyuvante sublingual. El agonista de TLR4, en particular, está disponible a bajo precio y ha sido usado para seres humanos. Por ejemplo, LPS de *Pantoea*, uno de los agonistas de TLR4 anteriores, ha sido usado comúnmente en productos alimentarios naturales y ofrece la ventaja de ser fácilmente adaptables a las personas.

10 La composición de vacuna para el uso de acuerdo con la presente invención puede contener preferiblemente los anteriores coadyuvantes TLR4 en una cantidad, por ejemplo, que se encuentra en el intervalo de 0,1 µg a 100 mg a la cantidad total del mismo. Una cantidad inferior a 0,1 µg puede dar lugar a una función insuficiente para ser un agente preventivo o terapéutico para enfermedades infecciosas, mientras que una cantidad superior a 100 mg puede suscitar un problema de seguridad. El contenido de límite inferior más preferible de los coadyuvantes anteriores es 0,3 µg, y el contenido límite superior más preferible es de 50 mg.

15 Además, la composición de vacuna para uso de acuerdo con la presente invención puede utilizar otros coadyuvantes conocidos usados convencionalmente en combinación con estos coadyuvantes en la medida en que la composición contenga al menos un coadyuvante seleccionado entre el grupo consistente en los coadyuvantes anteriores.

La composición de vacuna para uso de acuerdo con la presente invención se puede preparar añadiendo otros componentes (por ejemplo, tampón de fosfato, y similares) como sea necesario, al antígeno anterior derivado de una enfermedad infecciosa y los coadyuvantes, y mezclar con agitación por un método conocido.

20 La composición de vacuna de la presente invención puede también formularse en una solución, un preparado sólido o un aerosol, y adecuadamente utiliza, si se desea, un excipiente, aglutinante, perfume, saborizante, edulcorante, colorante, conservante, antioxidante, estabilizante, agente tensioactivo, y/o similares, además de los materiales descritos anteriormente.

Estos aditivos no están limitados y pueden ser utilizados los materiales conocidos utilizados convencionalmente.

25 El preparado sólido del presente documento abarca comprimidos, comprimidos recubiertos, polvos, gránulos, gránulos finos, comprimidos de desintegración oral, parches orales, jaleas y películas, y no está limitado en la medida en que es un preparado sólido para ser administrado a la mucosa de la cavidad oral o la mucosa sublingual .

30 La composición de vacuna para uso de acuerdo con la presente invención se administra a la mucosa cavidad oral de seres humanos o animales (mamíferos, aves, o similares), pero la administración en la mucosa de la cavidad oral es preferentemente administración sublingual. Como se describió anteriormente, no es probable generalmente que la mucosa de la cavidad oral desarrolle inmunidad, y se ha considerado que la activación de la inmunidad, incluso si se desarrolla inmunotolerancia, es difícil. Sin embargo, la composición de vacuna para uso de acuerdo con la presente invención utiliza los coadyuvantes específicos descritos anteriormente en combinación con al menos un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa, y por tanto induce eficazmente la respuesta inmunitaria sistémica y la respuesta inmunitaria mucosal, incluso cuando se administra a la mucosa de la cavidad oral.

40 La administración en la mucosa sublingual permite también que la composición sea menos susceptible a las influencias de los jugos gástricos y de las proteasas, a diferencia de la administración de antígeno a la mucosa gastrointestinal; y que esté libre de efectos adversos críticos potenciales, tales como la encefalopatía aguda, o similares; que sea fácil de practicar en ancianos, bebés, o similares; y que proporcione efectos estables ininterrumpidos por factores físicos tales como el moco nasal, o similares, a diferencia de la administración del antígeno a la mucosa transnasal.

45 El método para administrar la composición de vacuna de la presente invención es como se describió anteriormente. La dosis se determina de acuerdo con la especie, la edad, el sexo, el peso corporal del animal al que debe administrarse, y similares, y, por ejemplo, se administra generalmente de 0,1 µg a 50 µg típicamente una vez o más de dos veces cuando se utiliza HA como antígeno derivado de una enfermedad infecciosa. La composición de vacuna se administra preferiblemente en varias dosis, y la composición en este caso se administra preferiblemente con 1 a 4 semanas intermitentemente. Para usar virus completo inactivado como antígeno derivado de una enfermedad infecciosa, la dosis se determina en términos de HA. Adicionalmente, el peso de HA es un valor medido por el título de SRD o el método de Lowry.

50 La composición de vacuna para uso de acuerdo con la presente invención utiliza los coadyuvantes específicos descritos anteriormente en combinación con al menos un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa, y por lo tanto induce eficazmente la respuesta inmunitaria sistémica y la respuesta inmunitaria mucosal cuando se administra a la mucosa de la cavidad oral, en particular la mucosa sublingual.

55 La Fig. 1 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgG específica de HA de la gripe del suero de ratón en los Ejemplos 1 a 6 y los Ejemplos Comparativos 1 a 9.

La Fig. 2 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgA específica de HA de la gripe del lavado nasal de ratón en los Ejemplos 1 a 6 y Ejemplos Comparativos 1 a 9.

La Fig. 3 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgG específica de HA de la gripe del suero de ratón en los Ejemplos 7 a 9 y Ejemplos Comparativos 10 a 12.

5 La Fig. 4 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgA específica de la HA de la gripe del lavado nasal de ratón en los Ejemplos 7 a 9 y Ejemplos Comparativos 10 a 12.

La Fig. 5 es una gráfica que muestra las tasas de supervivencia de ratones infectados con virus de la gripe en el Ejemplo 10, Ejemplos Comparativos 13 y 14.

10 La Fig. 6 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgG específica de la HA de la gripe del suero de ratón en los Ejemplos 11, Ejemplos Comparativos 1 y 14.

La Fig. 7 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgA específica de HA de la gripe del lavado nasal de ratón en los Ejemplos 11, Ejemplos Comparativos 1 y 14.

La Fig. 8 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgG específica de la HA de la gripe de suero de ratón en los Ejemplos 12 y 13, Ejemplos Comparativos 15, 16 y 1.

15 La Fig. 9 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgA específica de HA de la gripe del lavado nasal de ratón en los Ejemplos 12 y 13, Ejemplos Comparativos 15, 16 y 1.

La Fig. 10 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgG específica de la HA de la gripe del suero de ratón en los Ejemplos 12, 14 y 15, Ejemplos Comparativos 16 y 1.

20 La Fig. 11 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgA específica de HA de la gripe del lavado nasal de ratón en los Ejemplos 12, 14 y 15, Ejemplos Comparativos 16 y 1.

La Fig. 12 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgG específica de HA de la gripe del suero de ratón en los Ejemplos 16 y 17, Ejemplos Comparativos 17 y 18.

La Fig. 13 es una gráfica que muestra los resultados del título de IgA específica de HA de la gripe del lavado nasal de ratón en los Ejemplos 16 y 17, Ejemplos Comparativos 17 y 18.

25 En adelante, la presente invención se describe con más detalle con referencia a los ejemplos que siguen, pero no está limitada a ellos.

Ejemplo 1.

30 Se añadió tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) a 76,3 μ L (236 μ g/mL) de una solución que contiene antígeno HA de la gripe (A/IVPR8/34 (H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University (Fundación para la Investigación de Enfermedades Microbianas de la Universidad de Osaka)) y 30 μ L (1 mg/ml) de una solución que contiene lipopolisacárido de *E. Coli* (Nacalai Tesque, Inc.) para preparar 120 μ L de una composición de vacuna.

35 Cinco ratones (ratones hembra C57BL/6 de 7 semanas de edad, Japan SLC, Inc.) preparados de antemano fueron anestesiados (Somnopentyl, Kyoritsu Seiyaku Corporation), y se administraron por vía sublingual 20 μ L de la composición de vacuna preparada, a cada uno de los ratones.

1 semana después de la administración, los ratones fueron anestesiados de nuevo y se administraron por vía sublingual 20 μ L de la composición de vacuna preparada a cada uno de los ratones.

40 Otra semana después de la segunda administración, se recolectaron el lavado nasal y el suero de los ratones, y se determinó el título de IgG específico de HA de la gripe del suero y el título de IgA específico de HA de la gripe del lavado nasal mediante ELISA. El método de medida se describe más adelante con detalle.

Ejemplos 2 a 6.

45 Las composiciones de vacuna se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que, en vez del lipopolisacárido de *E. coli*, se utilizó lipopolisacárido de *Pantoea* (Macrophilnc.) en el Ejemplo 2, se utilizó glucopiranosil lípido (MPLAs, InvivoGen) en el Ejemplo 3, se utilizó FSL-1 (InvivoGen) en el Ejemplo 4, se utilizó Pam₂CSK₄ (InvivoGen) en el Ejemplo 5 y se utilizó c-di-GMP (diguanosin monofosfato cíclico, Biolog Inc.) en el Ejemplo 6. El ensayo se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en las dosis mostradas en la Tabla 1.

Ejemplo Comparativo 1.

5 Se anestesiaron cinco ratones (ratones hembra C57BL/6 de 7 semanas de edad, Japan SLC, Inc.) preparados de antemano, se prepararon 120 µL de tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) y 20 µL del mismo se administraron por vía sublingual a cada uno de los ratones. La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 subsiguiente.

Ejemplo Comparativo 2.

10 En vez del tampón de fosfato, se añadió tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) a 76,3 µL (236 µg/mL) de una solución que contiene antígeno HA de la gripe (A/IvPR8/34 (H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University), para preparar 120 µL de una composición de vacuna. La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 subsiguiente en la dosis mostrada en la Tabla 1.

Ejemplos Comparativos 3 a 9.

15 Se prepararon composiciones de vacuna de la misma manera que en el Ejemplo Comparativo 2, excepto que, además de la solución que contiene el antígeno HA de la gripe (A/IvPR8/34(H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University), se usó peptidoglicano (PGN derivado de *Salmonella*, InvivoGen) en el Ejemplo Comparativo 3, se utilizó *zymosan* (Nacalai Tesque, Inc.) en el Ejemplo Comparativo 4, se usó Pam₃CSK₄ (InvivoGen) en el Ejemplo Comparativo 5, se utilizó Poly (I : C) (InvivoGen) en el Ejemplo Comparativo 6, se usó flagelina (InvivoGen) en el Ejemplo Comparativo 7, se usó imiquimod (InvivoGen) en el Ejemplo Comparativo 8 y se usó CpG (InvivoGen) en el Ejemplo Comparativo 9. El ensayo se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en las dosis que se indican en la Tabla 1.

20 Tabla 1

Nº	antígeno		coadyuvante	
	dosis (µg/cuerpo/tiempo)	Ligando	Nombre de la sustancia	dosis (µg/cuerpo/tiempo)
Ejemplo 1	3	TLR4	LPS de <i>E. coli</i>	5
Ejemplo 2	3	TLR4	LPS de <i>Pantoea</i>	5
Ejemplo 3	3	TLR4	GLA	5
Ejemplo 4	3	TLR 2/6	FSL-1	5
Ejemplo 5	3	TLR 2/6	Pam ₂ CSK ₄	5
Ejemplo 6	3	no claro	c-di-GMP	138
Ejemplo Comparativo 1	-	-	-	-
Ejemplo Comparativo 2	3	-	-	-
Ejemplo Comparativo 3	3	TLR 2	PGN	100
Ejemplo Comparativo 4	3	TLR 2/dectina 1	zymosan	5
Ejemplo Comparativo 5	3	TLR2/1	Pam ₂ CSK ₄	5
Ejemplo Comparativo 6	3	TLR3	poli I : C	5
Ejemplo Comparativo 7	3	TLR5	flagelin	5
Ejemplo Comparativo 8	3	TLR7	imiquimod	5
Ejemplo Comparativo 9	3	TLR9	CpG	5

Ejemplos 7 a 9.

Además de 19 µL (236 µg/mL) de la solución que contiene el antígeno HA de la gripe (A/IvPR8/34(H1N1) The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University), se añadió tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) a 30 µL (1 µg/mL) de glucopiranosil lípido (MPLAs, InvivoGen) para preparar 120 µL de una composición de vacuna en el Ejemplo 7. Se administraron 20 µL del mismo por vía sublingual a los ratones (ratones hembra de 7 semanas de edad BALB/ c, Japan SLC, Inc.) bajo anestesia. En vez del glucopiranosil lípido usado en el Ejemplo 7, se utilizó FSL-1 (InvivoGen) en el Ejemplo 8, y se utilizó c-di-GMP (monofosfato de diguanosina cíclico, Biolog Inc.) en el Ejemplo 9 para preparar composiciones de vacuna. Las dosis son como se muestran en la Tabla 2. El ensayo se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 después de la preparación, excepto que el tipo de ratón era diferente.

Ejemplo Comparativo 10.

Se añadió tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) a 19 µL (236 µg/mL) de la solución que contiene antígeno HA de la gripe (A/IvPR8/34(H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University) para preparar 120 µL de una composición de vacuna. La dosis fue como se muestra en la Tabla 2. El ensayo se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 después de la preparación, excepto que se usaron ratones BALB/c.

Ejemplos Comparativos 11 y 12.

Además de 76,3 µL (236 µg/mL) de la solución que contiene el antígeno HA de la gripe (A/IvPR8/34(H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University), en el Ejemplo Comparativo 11, se añadió tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) a 30 µL (20 µg/mL) de peptidoglicano (PGN derivado de *Salmonella*, InvivoGen) para preparar 120 µL de una composición de vacuna. En vez del peptidoglicano utilizado en el Ejemplo Comparativo 11, se utilizó Pam₃CSK₄ (InvivoGen) en el Ejemplo Comparativo 12 para preparar una composición de vacuna. Las dosis fueron como se muestra en la Tabla 2. El ensayo se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 después de la preparación, excepto que se usaron ratones BALB/c.

[Tabla 2]

Nº	Antígeno		Coadyuvante		
	Tipo	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)	Ligando	Nombre de la sustancia	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)
Ejemplo 7	A/IvPR8/34(H1N1)	0,75	TLR4	GLA	5
Ejemplo 8	A/IvPR8/34(H1N1)	0,75	TLR2/6	FSL-1	5
Ejemplo 9	A/IvPR8/34(H1N1)	0,75	no claro	c-di-GMP	138
Ejemplo Comparativo 10	A/IvPR8/34(H1N1)	0,75	-	-	-
Ejemplo Comparativo 11	A/IvPR8/34(H1N1)	0,75	TLR2	PGN	100
Ejemplo Comparativo 12	A/IvPR8/34(H1N1)	0,75	TLR2/1	Pam ₃ CSK ₄	5

Ejemplo 10

Se añadieron tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) y 60 µL (1 mg/mL) de lipopolisacárido derivado de *Pantoea* (Macrophilinc.) a 152,6 µL (236 µg/mL) de la solución que contiene el antígeno HA de la gripe (A/IvPR8/34(H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University), para preparar 240 µL de una composición de vacuna.

Se anestesiaron diez ratones (ratones hembra BALB/c de 7 semanas de edad, Japan SLC, Inc.) preparados de antemano y se administraron por vía sublingual 20 µL de la composición de vacuna preparada a cada uno de los ratones.

Una semana después de la administración, los ratones fueron anestesiados de nuevo y se administraron por vía sublingual 20 µL de la composición de vacuna preparada a cada uno de los ratones.

Otra semana después de la segunda administración, los ratones fueron infectados con la dosis letal de virus de la gripe (A/IvPR8/34(H1N1)) y controlados durante las dos semanas siguientes para determinar las tasas de supervivencia. El método de medida se describe más adelante con detalle.

Ejemplos Comparativos 13 y 14.

- 5 En el Ejemplo Comparativo 13, se preparó una solución que contiene solamente la solución que contiene el antígeno HA de la gripe (A/IvPR8/34(H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University), y en el Ejemplo Comparativo 14 se preparó un tampón de fosfato. La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 10 en las dosis mostradas en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Nº	Antígeno		Coadyuvante		
	Tipo	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)	Ligando	Nombre de la sustancia	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)
Ejemplo 10	A/IvPR8/34(H1N1)	3	TLR4	LPS de <i>Pantoea</i>	5
Ejemplo Comparativo 13	A/IvPR8/34(H1N1)	3	-	-	-
Ejemplo Comparativo 14	-	-	-	-	-

Ejemplo 11.

- 10 Se añadieron tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) y 30 µL (1 mg/mL) de lipopolisacárido derivado de *Pantoea* (Macrophilinc) a 10,1 µL (1,776 µg/mL) de una solución de virus completo inactivado que contiene antígeno HA de la gripe (A/California/7/2009 (H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University), para preparar 120 µL de una composición de vacuna.

La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 4.

Ejemplo Comparativo 14.

- 15 En el Ejemplo Comparativo 14 se preparó una solución que contiene solamente la solución de virus completo inactivado que contiene antígeno HA del virus de la gripe(A/California/7/2009 (H1N1)). La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Nº	Antígeno		Coadyuvante		
	Tipo	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)	Ligando	Nombre de la sustancia	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)
Ejemplo 11	Virus completo inactivado (A/California/7/2009(H1N1))	3	TLR4	LPS de <i>Pantoea</i>	5
Ejemplo Comparativo 14	Virus completo inactivado (A/California/7/2009(H1N1))	3	-	-	-
Ejemplo Comparativo 1	-	-	-	-	-

20 Ejemplo 12.

Se añadieron tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) y 30 µL (1 µg/mL) de lipopolisacárido derivado de *Pantoea* (Macrophilinc.) a 36 µL (500 µg/mL) de una solución que contiene el antígeno HA de la gripe (A/California/7/2009 (H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University), para preparar 120 µL de una composición de vacuna.

- 25 La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 5.

Ejemplo 13.

En vez del lipopolisacárido derivado de *Pantoea* usado en el Ejemplo 12, se usó c-di-GMP (monofosfato de diguanosina cíclico, Biolog Inc.) en el Ejemplo 13 para preparar una composición de vacuna de la misma manera

que en el Ejemplo 12. La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 5.

Ejemplo Comparativo 15.

- 5 En vez del lipopolisacárido derivado de *Pantoea* utilizado en el Ejemplo 12, se utilizó imiquimod (InvivoGen) en el Ejemplo Comparativo 15 y la prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 5.

Ejemplo Comparativo 16.

- 10 En vez del lipopolisacárido derivado de *Pantoea* utilizado en el Ejemplo 12, se preparó una solución que contiene solamente la solución que contiene el antígeno HA de la gripe (A/IvPR8/34(H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University) sin adición de ningún otro componente en el Ejemplo Comparativo 16. La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 5.

[Tabla 5]

Nº	Antígeno		Coadyuvante		
	Tipo	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)	Ligando	Nombre de la sustancia	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)
Ejemplo 12	(A/California/7/2009(H1N1))	3	TLR4	LPS de <i>Pantoea</i>	5
Ejemplo 13	(A/California/7/2009(H1N1))	3	no claro	c-di-GMP	5
Ejemplo Comparativo 15	(A/California/7/2009(H1N1))	3	TLR7	imiquimod	5
Ejemplo Comparativo 16	(A/California/7/2009(H1N1))	3	-	-	-
Ejemplo Comparativo 1	-	-	-	-	-

Ejemplo 14.

- 15 Se añadieron tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) y 30 µL (1 mg/mL) de lipopolisacárido derivado de *Pantoea* (Macrophil Inc.) a 33,7 µL (534 µg/mL) de la solución que contiene el antígeno HA de la gripe (A/Victoria/361/2009 H₃N₂), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University) para preparar 120 µL de una composición de vacuna. La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 6.

- 20 Ejemplo 15.

- 25 Se añadieron tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) y 30 µL (1 mg/mL) de lipopolisacárido derivado de *Pantoea* (Macrophil Inc.) a 47,4 µL (380 µg/mL) de la solución que contiene el antígeno HA de la gripe (B/Brisbane/60/2008), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University) para preparar 120 µL de una composición de vacuna. La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 6.

[Tabla 6]

Nº	Antígeno		Coadyuvante		
	Tipo	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)	Ligando	Nombre de la sustancia	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)
Ejemplo 12	A/California/7/2009(H1N1)	3	TLR4	LPS de <i>Pantoea</i>	5
Ejemplo 14	A/Victoria/361/2009 (H ₃ N ₂)	3	TLR4	LPS de <i>Pantoea</i>	5
Ejemplo 15	B/Brisbane/60/2008	3	TLR4	LPS de <i>Pantoea</i>	5
Ejemplo Comparativo 16	A/California/7/2009(H1N1)	3	-	-	-
Ejemplo Comparativo 1	-	-	-	-	-

Ejemplo 16.

5 Se preparó una composición de vacuna de la misma manera que en el Ejemplo 12. Más concretamente, se añadieron tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc .) y 30 µL (1 mg/ mL) de lipopolisacárido derivado de *Pantoea* (Macrophil Inc.) a 36 µL (500 µg/mL) de una solución que contiene antígeno HA de la gripe (A/California/7/2009 (H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University) para preparar 120 µL de una composición de vacuna.

10 La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 7, excepto que se usaron ratones BALB/c.

Ejemplo 17.

Se añadieron tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) y 30 µL (1 mg/mL) de lipopolisacárido derivado de *Pantoea* (Macrophil Inc.) a 18 µL (1 mg/mL) de OVA (Ovalbúmina, Sigma-Aldrich Co. LLC.) para preparar 120 µL de una composición de vacuna.

15 La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 7, excepto que se usaron ratones BALB/c.

Ejemplo Comparativo 17.

20 En vez del lipopolisacárido derivado de *Pantoea* utilizado en el Ejemplo 16, se preparó una solución que contiene solamente el antígeno HA de la gripe (A/IvPR8/34(H1N1), The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University) sin la adición de ningún otro componente en el Ejemplo Comparativo 17. La prueba se realizó por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 7, excepto que se usaron ratones BALB/c.

Ejemplo Comparativo 18.

25 En vez del lipopolisacárido derivado de *Pantoea* utilizado en el Ejemplo 17, se preparó una solución que contiene solamente OVA (Ovalbúmina, Sigma-Aldrich Co. LLC.) sin la adición de ningún otro componente en el Ejemplo Comparativo 18. La prueba se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 en la dosis mostrada en la Tabla 7, excepto que se usaron ratones BALB/c.

[Tabla 7]

Nº	Antígeno		Coadyuvante		
	Tipo	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)	Ligando	Nombre de la sustancia	Dosis (µg/cuerpo/tiempo)
Ejemplo 16	(A/California/7/2009(H1N1))	3	TLR4	LPS de <i>Pantoea</i>	5
Ejemplo 17	Ovoalbúmina (OVA)	3	TLR4	LPS de <i>Pantoea</i>	5
Ejemplo Comparativo 17	(A/California/7/2009(H1N1))	3	-	-	-
Ejemplo Comparativo 18	Ovoalbúmina (OVA)	3	-	-	-

Método de ensayo.

- 5 La respuesta inmunitaria sistémica se evaluó midiendo el título de IgG específica de OVA o de HA de la gripe del suero de ratón. La respuesta inmunitaria mucosal se evaluó midiendo el título de IgA específica de OVA o de HA de la gripe del lavado nasal de ratón. Cada uno de los resultados de la evaluación se muestran en las Figs. 1 a 13 (excepto la Fig. 5).
- Mientras tanto se llevó a cabo un experimento de infección por el virus para revelar la eficacia de la vacuna mediante la infección de los ratones con el virus de la gripe. Los resultados de la evaluación se muestran en la Fig. 5.
- 10 Método de medida del título de IgG específica de HA de la gripe del suero de ratón (ELISA).
- Se añadieron 100 µL de cada HA de la gripe (por ejemplo, solución de antígeno HA de la gripe A/IvPR8/34 (H1N1)) para la medida de un título de anticuerpo IgG específico de A/IvPR8/34 (H1N1)) diluido con tampón de carbonato o una solución que contiene OVA (5 µg/mL), a una placa de ELISA de 96 pocillos y se dejó reposar durante la noche.
- 15 Los pocillos se lavaron 3 veces con un líquido de lavado (PBS que contiene Tween 20) preparado de antemano, y 200 µL de una solución de bloqueo en la que el agente de bloqueo (Block Ace, DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) estaba diluido a 4 g/100 mL con agua purificada se añadió a cada pocillo, que se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Subsiguientemente, los pocillos se lavaron 3 veces con el lavado (PBS que contiene Tween 20).
- 20 El suero recogido de antemano de los ratones se centrifugó a 4 °C a 3.000 g durante 10 minutos, se añadieron 300 µL de tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.) a 20 µL del sobrenadante para preparar una solución diluida de suero.
- Usando una solución en la que un agente de bloqueo (Block Ace, DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) estaba diluido a 0,4 g/100 mL con tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.), la solución de suero diluida anterior se diluyó dos veces en 16 etapas, y se añadieron 50 µL de la solución, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 25 Los pocillos se lavaron 3 veces con un lavado (PBS que contiene Tween 20), un anticuerpo IgG anti-ratón marcado con HRP (IgG anti-ratón de cabra Fc HRP, BETHYL Laboratories, Inc.) se diluyó 10.000 veces con la solución en la que un agente de bloqueo (Block Ace, DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) estaba diluido a 0,4 g/100 mL con tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.), y se añadieron 100 µL a cada uno y se dejó reposar a la temperatura ambiente durante 1 hora.
- 30 A continuación, los pocillos se lavaron 3 veces con el lavado (PBS que contiene Tween 20) y se añadieron 100 µL a cada uno de una solución de TMB (*kit* ELISA POD TMB, Nacalai Tesque, Inc.). Se añadieron 100 µL de una solución de ácido sulfúrico 1 M y la placa de 96 pocillos se midió utilizando un lector de microplacas (168-11135CAM, Bio-Rad Laboratories, Inc.) para medir la absorbancia a 450 nm. Los títulos de IgG del suero de ratón se determinaron en log₂ basándose en la absorbancia en el momento de la dilución en etapas.
- 35 Método de medida del título de IgA específica del HA de la gripe del lavado nasal de ratón (ELISA).
- Se añadieron 100 µL de cada HA de la gripe (p. ej. HA de la gripe A/IvPR8/34 (H1N1)) para medir un título de anticuerpos IgA específico de A/IvPR8/34 (H1N1)) diluido con tampón de carbonato o una solución que contiene OVA (5 µg/mL) a una placa de 96 pocillos de ELISA y se dejó reposar durante la noche.

Los pocillos se lavaron 3 veces con un líquido de lavado (PBS que contiene Tween 20) preparado de antemano, y 200 µL de una solución de bloqueo en la que un agente de bloqueo (Block Ace, DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) estaba diluido hasta 4 g/100 mL con agua purificada se añadieron a cada pocillo, que se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas.

- 5 Los pocillos se lavaron subsiguientemente 3 veces con un líquido de lavado (PBS que contiene Tween 20). Los lavados nasales recogidos de los ratones se diluyeron dos veces en 12 etapas con la solución en la que un agente de bloqueo (Block Ace, DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) se diluyó a 0,4 g/100 mL con tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.), y se añadieron 50 µL a cada uno de la solución y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 10 Los pocillos se lavaron 3 veces con un líquido de lavado (PBS que contiene Tween 20), un anticuerpo IgA anti-ratón marcado con HRP (IgA anti-ratón de cabra Fc HRP, BETHYL Laboratories, Inc.) fue diluido 10.000 veces con la solución en la que un agente de bloqueo (Block Ace, DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) estaba diluido a 0,4 g/100 mL con tampón de fosfato (Nacalai Tesque, Inc.), y se añadieron 100 µL de cada uno de los mismos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Subsiguientemente, los pocillos se lavaron 3 veces con el líquido de lavado (PBS que contiene Tween 20) y se añadieron 100 µL cada uno de una solución de TMB (kit ELISA POD TMB, Nacalai Tesque, Inc.). Se añadieron 100 µL de una solución de ácido sulfúrico 1 M y la placa de 96 pocillos se midió utilizando un lector de microplacas (168-11135CAM, Bio-rad Laboratories, Inc.) para la absorbancia a 450 nm. Los títulos de IgA del lavado nasal de ratón se determinaron en log₂ basándose en la absorbancia en el momento de la dilución en etapas.
- 20 Experimento de infección con virus de la gripe A/IVPR8/34 (H1N1) en ratones (medida de la tasa de supervivencia).
15 µL de virus de la gripe A/IVPR8/34 (H1N1) diluido fueron administrados bajo anestesia a ratones a los que se han administrado vacuna 1 semana después de la administración final (10 x DL50: dosis letal 50%). Definiendo el día de la administración del virus como Día 0, los ratones fueron controlados hasta el día 14 para medir las tasas de supervivencia.
- 25 Como se muestra en las Figs. 1 y 2, la IgG y IgA específica de HA de la gripe fueron producidas con altos rendimientos en los Ejemplos 1 a 6, mientras que la IgA específica de la gripe producida en bajos rendimientos y la IgG específica de HA de la gripe se produce solamente algo en los Ejemplos Comparativos 1 a 9. Estos resultados revelaron que el dinucleótido cíclico agonista de TLR4 y agonista de TLR2/6, son eficaces como coadyuvantes para inducir la inmunidad mucosal cuando se administran por vía sublingual.
- 30 Como se muestra en las Figs. 3 y 4, la comparación entre los Ejemplos 7 a 9 y Ejemplos Comparativos 10 a 12 reveló que es probable que sean inducidas una suficiente inmunidad sistémica e inmunidad mucosal por la administración sublingual incluso en el sistema en el que la dosis de antígeno HA de la gripe se redujo a 0,75 µg.
Como se muestra en la Fig. 5, la comparación entre el Ejemplo 10 y los Ejemplos Comparativos 13 y 14 reveló que la inmunidad sublingual proporciona la completa protección para la infección contra la dosis letal del virus de la gripe.
- 35 Como se muestra en las Figs. 6 y 7, la comparación entre el Ejemplo 11 y Ejemplos Comparativos 14 y 1 reveló que es probable que sea inducida una suficiente inmunidad sistémica y mucosal en la vacuna de virus completo inactivado cuando se utilizan los coadyuvantes.
Como se muestra en las Figs. 8 y 9, la comparación entre los Ejemplos 12 y 13 y los Ejemplos Comparativos 15, 16 y 1 reveló que es probable que sea inducida inmunidad sistémica e inmunidad mucosal en A/California/7/2009 (H1N1), una gripe estacional infecciosa para el ser humano.
- 40 Como se muestra en las Figs. 10 y 11, la comparación entre los Ejemplos 12, 14 y 15 y los Ejemplos Comparativos 16 y 1 reveló que la inmunidad sublingual es probable que induzca la inmunidad sistémica y la inmunidad mucosal contra diferentes tipos de virus de la gripe.
- 45 Como se muestra en las Figs. 12 y 13, la comparación entre los Ejemplos 16 y 17 y los Ejemplos Comparativos 17 y 18 reveló que la inmunidad mucosal y la inmunidad sistémica específica de HA de la gripe y específica de OVA son altamente inducidas.
- 50 La composición de vacuna para uso de acuerdo con la presente invención utiliza los coadyuvantes específicos descritos anteriormente en combinación con al menos un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa, y así induce eficazmente la respuesta inmunitaria sistémica y la respuesta inmunitaria mucosal incluso cuando se administra en la mucosa de la cavidad oral.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna para uso en medicina, en donde la composición se ha de administrar a la mucosa de la cavidad oral de una persona o un animal, comprendiendo la composición de vacuna:
- al menos un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa, y
- 5 al menos un elemento seleccionado entre el grupo consistente en: un agonista del receptor 4 de tipo toll (TLR4),
- en donde el agonista del receptor 4 de tipo toll (TLR4) comprende al menos un elemento elegido entre el grupo consistente en un lipopolisacárido o una sal del mismo,
- en donde el lipopolisacárido o la sal del mismo se deriva de *Pantoea*, *Acetobacter*, *Zymomonas*, *Xanthomonas* o *Enterobacter*.
- 10 2. La composición de vacuna para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antígeno derivado de una enfermedad infecciosa es un antígeno derivado del virus de la gripe.
3. La composición de vacuna para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el antígeno derivado del virus de la gripe es la proteína hemaglutinina.
4. La composición de vacuna para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el antígeno derivado del virus de la gripe es un virus completo inactivado.
- 15 5. La composición de vacuna para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el liposacárido o la sal del mismo se deriva de *Pantoea*.
6. La composición de vacuna para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición de vacuna induce una respuesta inmunitaria mucosal y una respuesta inmunitaria sistémica, la respuesta inmunitaria mucosal es la producción de anticuerpo IgA específica del antígeno, y la respuesta inmunitaria sistémica es la producción de anticuerpo IgG específica del antígeno, y la producción inmunitaria mediada por células específica del antígeno.
- 20

Fig. 1

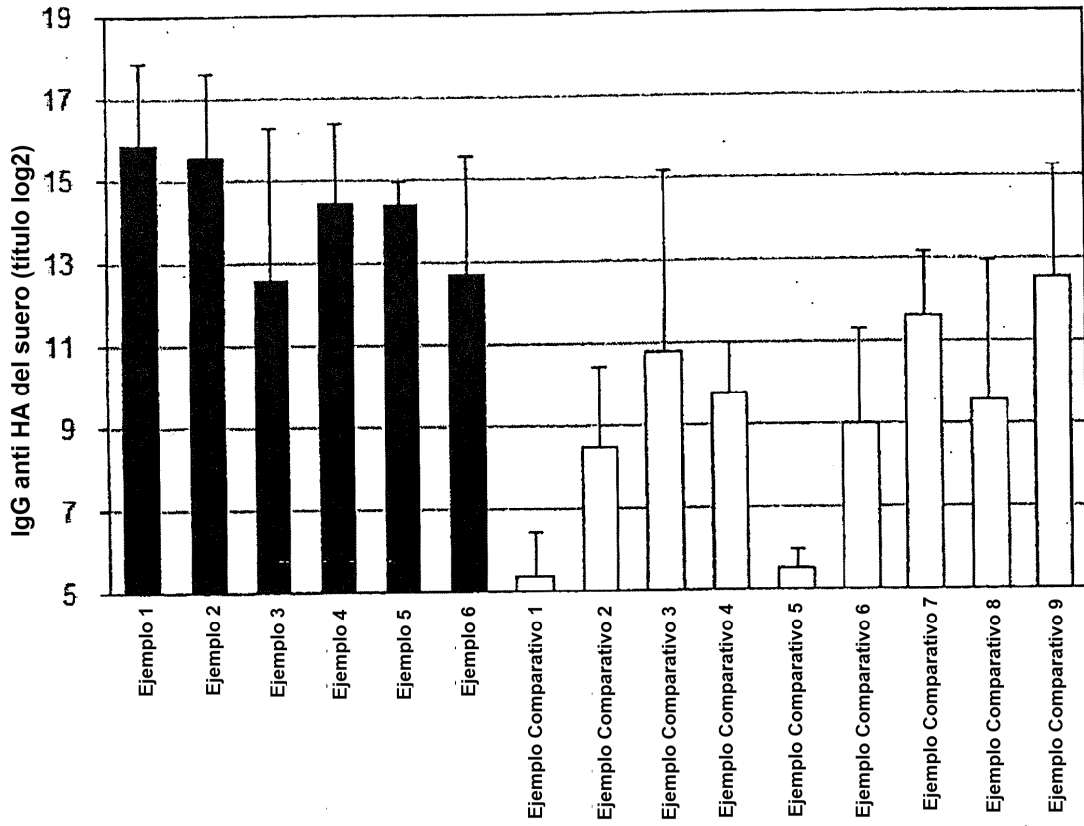


Fig. 2

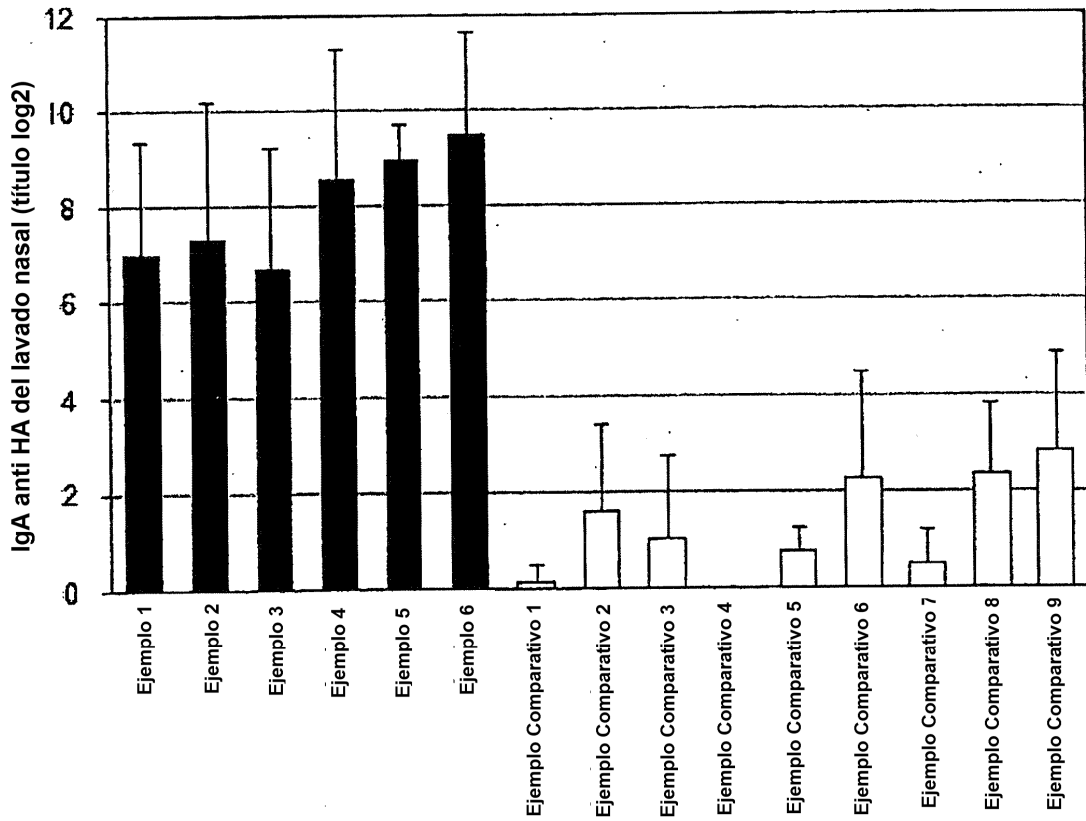


Fig.3

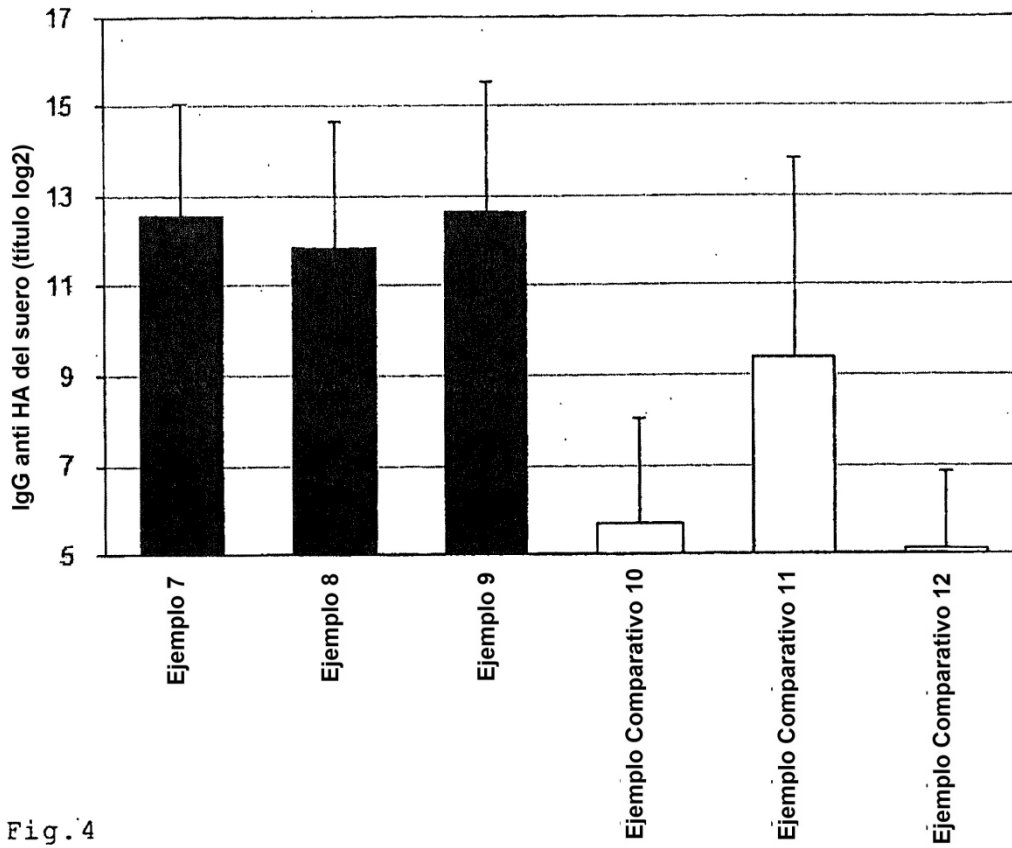


Fig.4

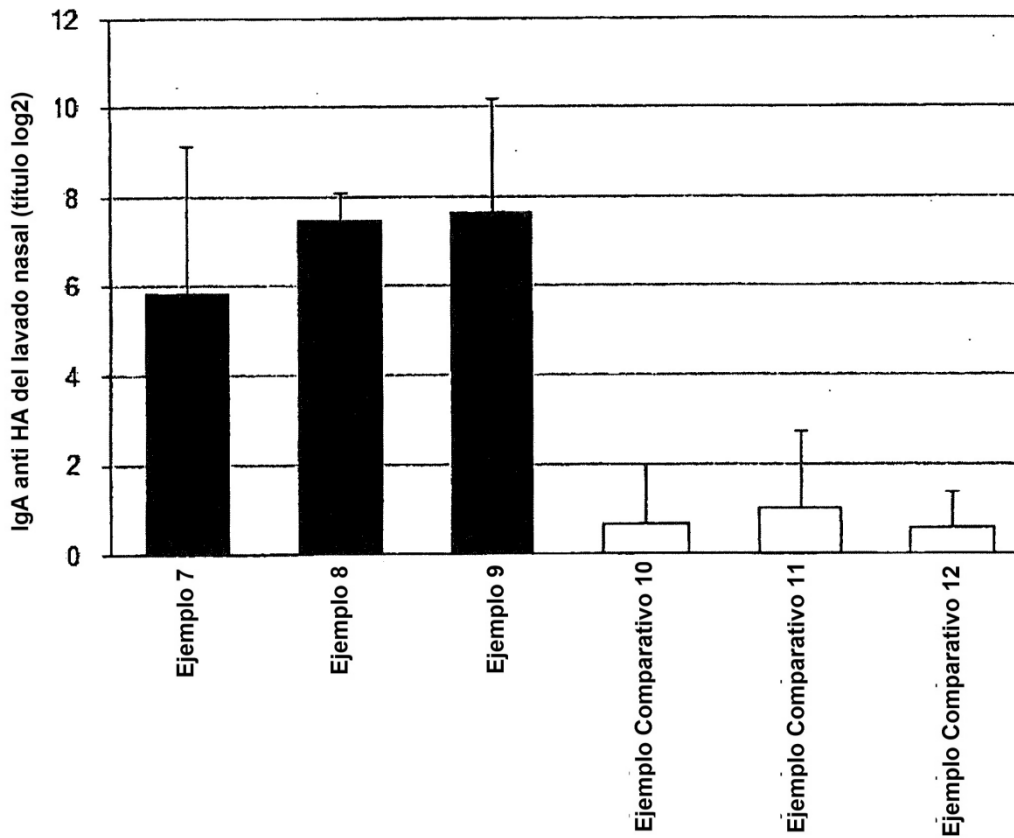


Fig. 5

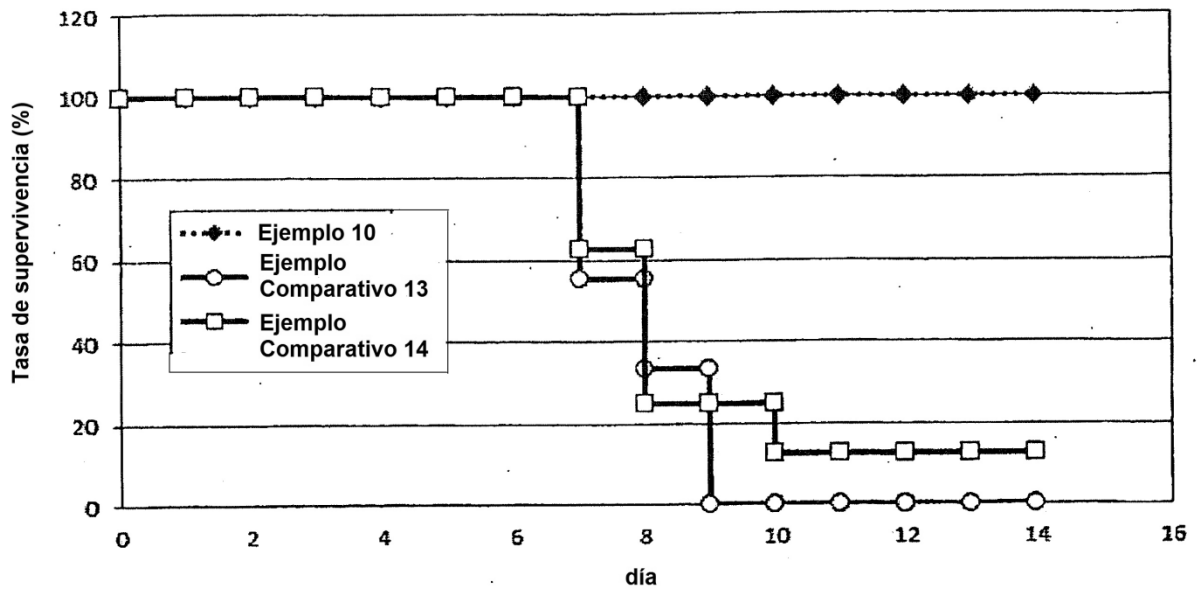


Fig. 6

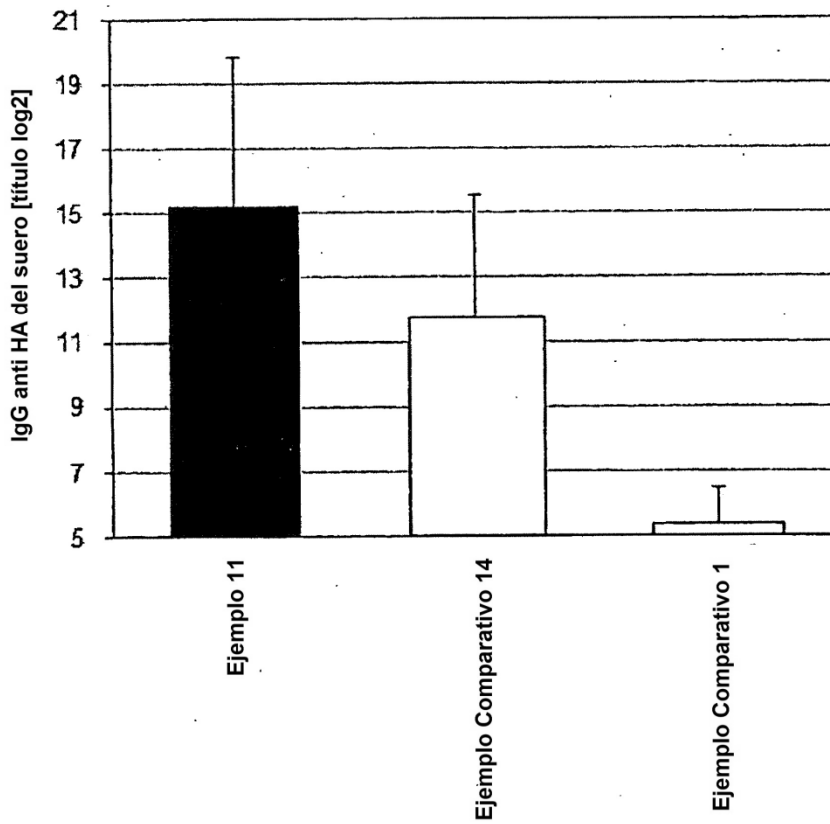


Fig.7

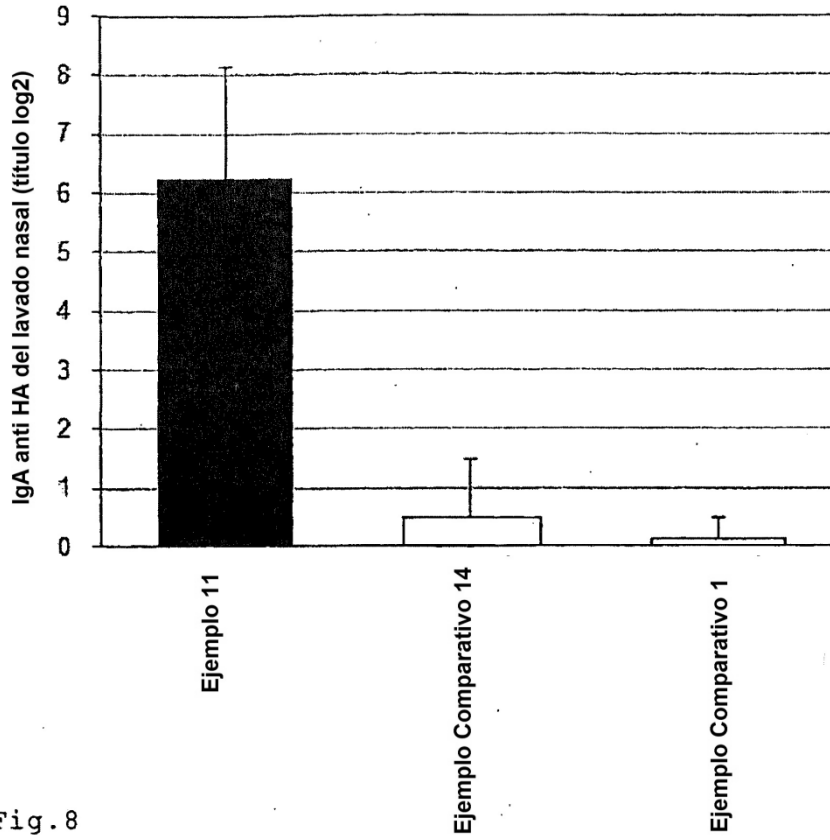


Fig.8

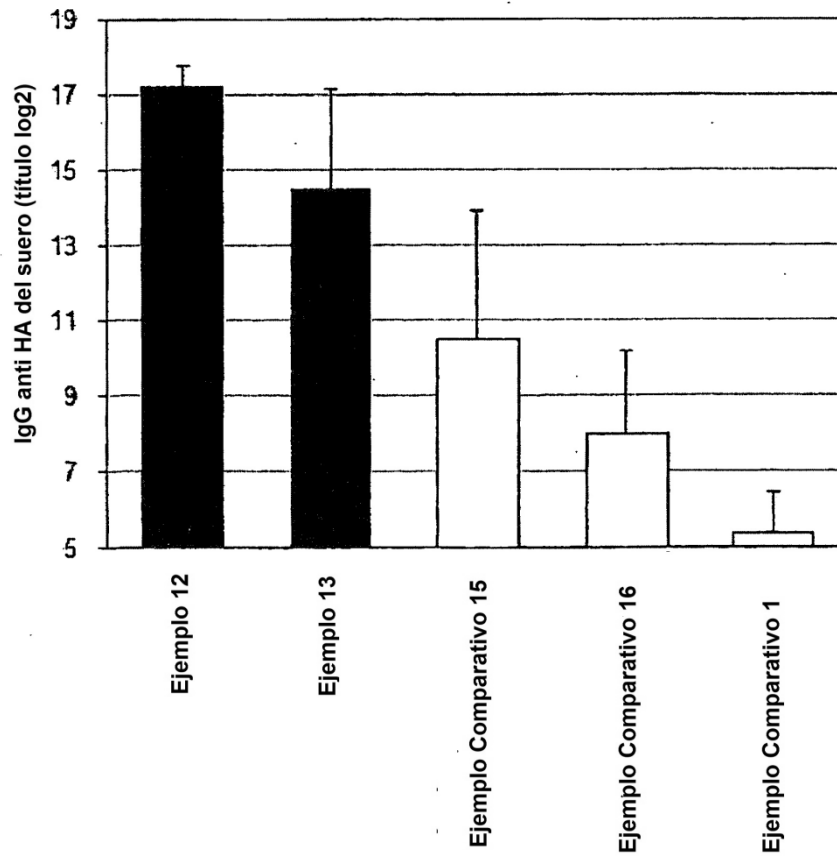


Fig.9

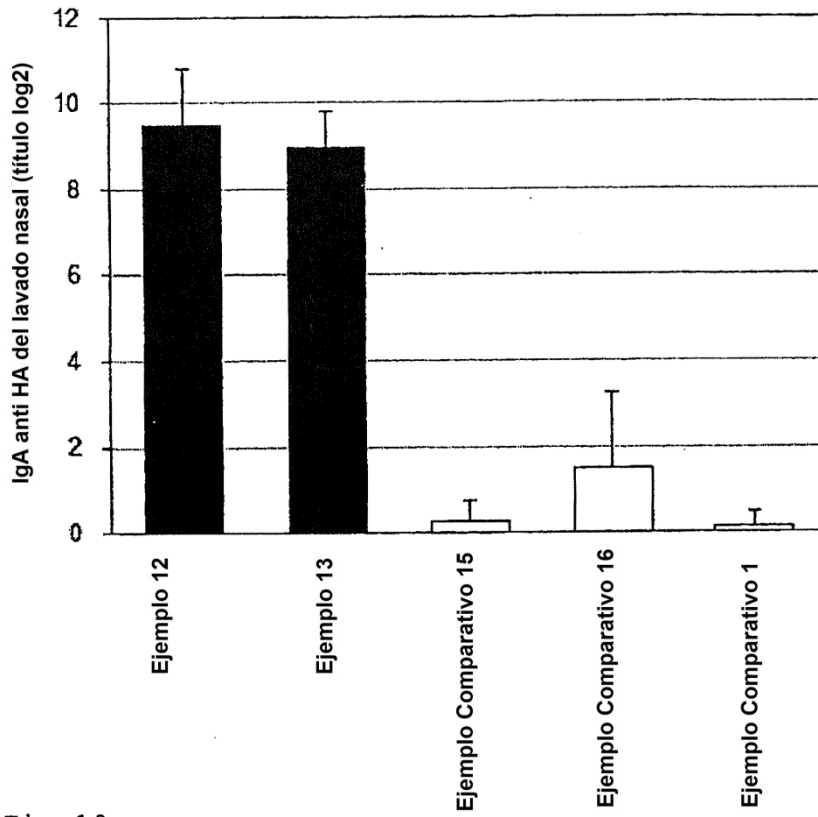


Fig.10

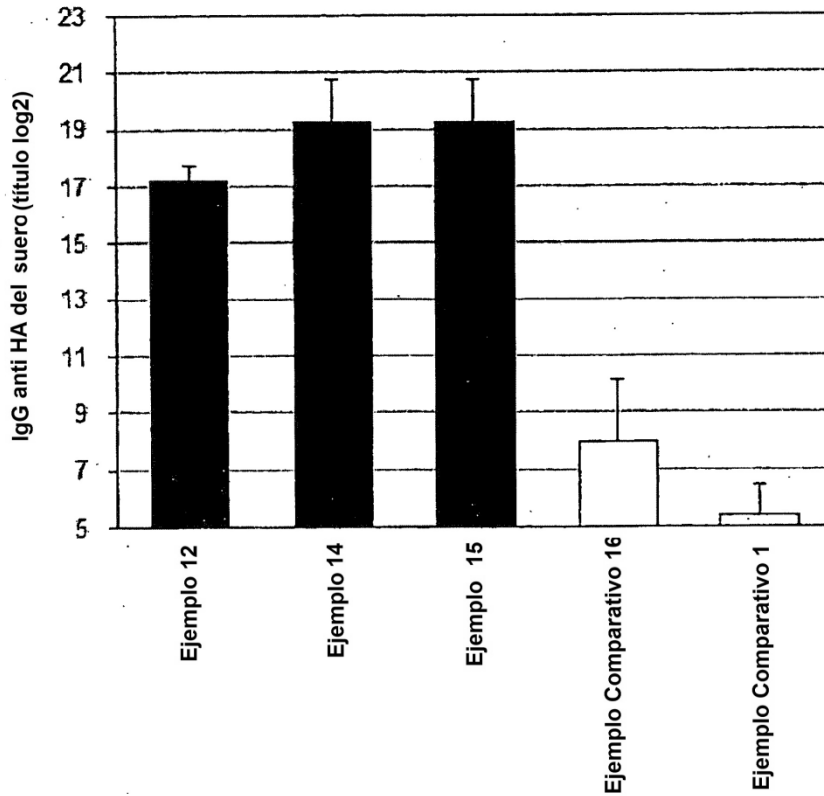


Fig. 11

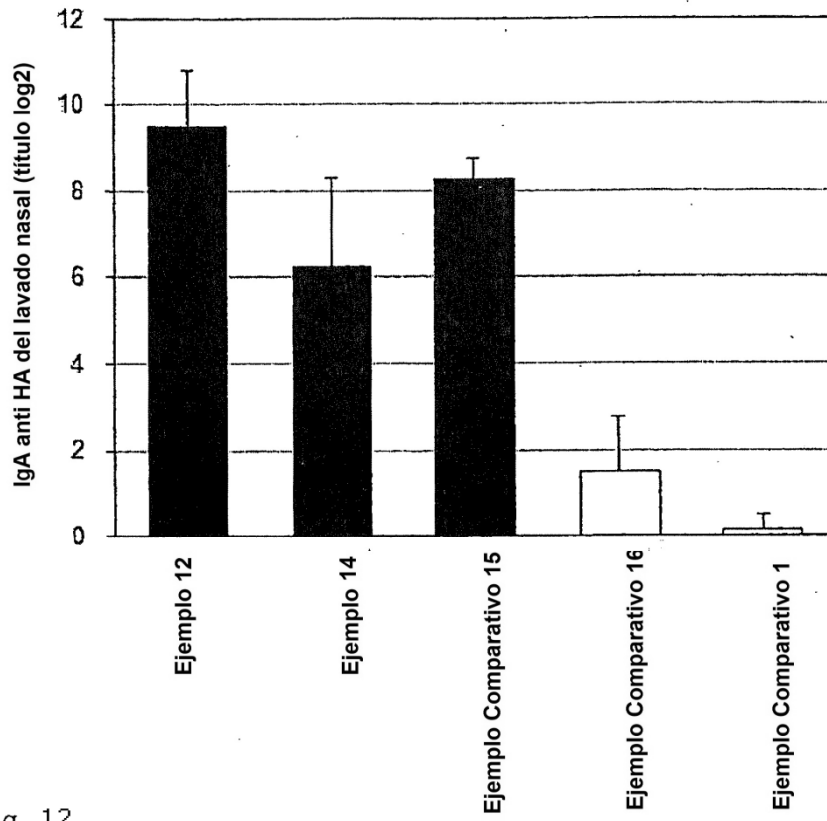


Fig. 12

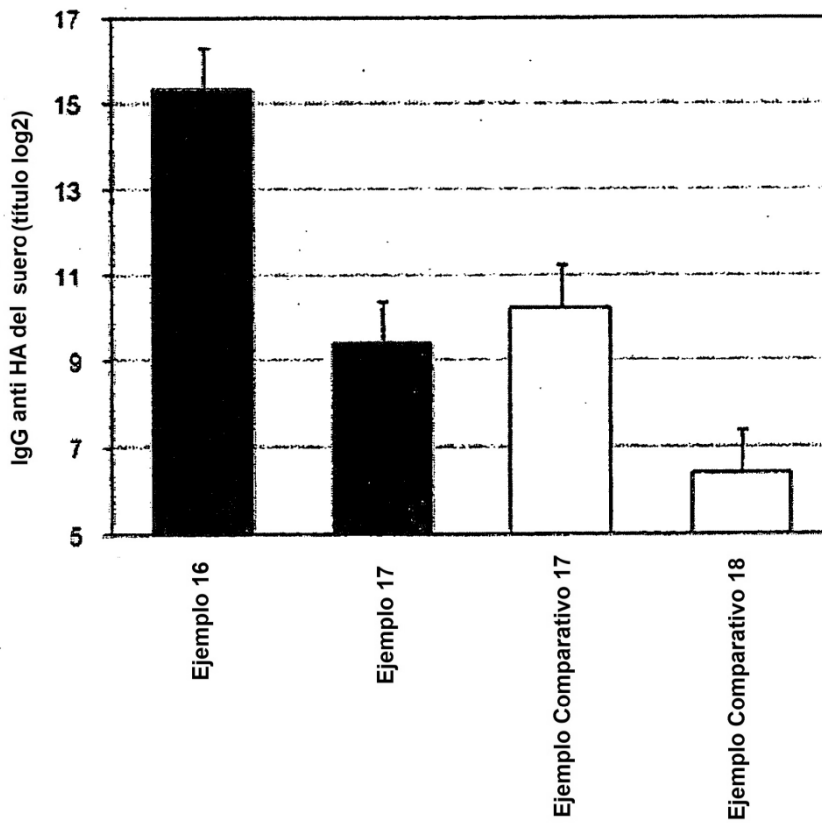


Fig. 13

