(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 588 183**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2010** **PCT/JP2010/056274**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010** **WO10114169**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010** **E 10714104 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016** **EP 2413961**

(54) Título: **Procedimiento para la prevención de la gripe utilizando una vacuna para administración intranasal**

(30) Prioridad:

31.03.2009 US 165098 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2016

(73) Titular/es:

JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR-GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES (33.3%)
1-23-1 Toyama Shinjuku-ku
Tokyo 162-8640, JP;
THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF OSAKA UNIVERSITY (33.3%) y TOKO YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA (33.3%)

(72) Inventor/es:

HASEGAWA, HIDEKI;
MANABE, SADAO;
TANIMOTO, TAKESHI;
MIYAZAKI, TAKASHI y
KAMISHITA, TAIZOU

(74) Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 588 183 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

Procedimiento para la prevención de la gripe utilizando una vacuna para administración intranasal

Sector técnico

La presente invención se refiere a una vacuna para la prevención de la gripe y a un procedimiento para la prevención de la gripe.

Antecedentes técnicos

La gripe es una enfermedad infecciosa viral que se vuelve epidémica de manera repetitiva con diferentes antígenos cada año. Las vacunas aprobadas en Japón para la prevención de la gripe son aquellas para la administración subcutánea. Dado que la vacunación induce un anticuerpo IgG que tiene una actividad neutralizante en el suero, es altamente eficaz para prevenir la progresión de la enfermedad a una más grave, tal como neumonía y similar. En la mucosa de las vías respiratorias superiores, que es el sitio de la infección, sin embargo, la IgA es el principal componente profiláctico. Dado que la IgA no es inducida mediante la administración subcutánea, el efecto preventivo de la infección no es suficiente. Por lo tanto, durante mucho tiempo se ha deseado el desarrollo de una vacuna preventiva de la infección.

Los inventores de la presente invención han desarrollado una vacuna contra la gripe para administración a través de la mucosa que comprende un ARN de doble cadena y un antígeno del virus de la gripe, que es superior en el efecto preventivo de la infección (documento WO2005/014038).

Descripción de la invención

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es dar a conocer una nueva vacuna que es útil para la prevención de la gripe y un procedimiento para la prevención de la gripe.

Para lograr el objetivo mencionado anteriormente, los inventores de la presente invención han tratado de examinar los efectos de las vacunas mediante la adición de diversos componentes, y han desarrollado la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención da a conocer lo siguiente.

[1] Una composición de vacuna para administración a través de la mucosa nasal, que comprende (i) un antígeno del virus de la gripe, (ii) ácido polirriboinosínico polirribocitidílico (poli (I:C)), poli ($I:C_xU$) o poli ($I_xU:C$), y (iii) un polímero de carboxivinilo, en la que x es de promedio un número de 3 a 40.

[2] La composición del punto [1], en la que el antígeno mencionado anteriormente es un antígeno subunidad o un antígeno inactivado.

[3] La composición del punto [2], en la que el antígeno subunidad mencionado anteriormente comprende, como mínimo, un antígeno subunidad seleccionado del grupo que comprende HA, NA, M1, M2, NP, PB1, PB2, PA y NS2 del virus de la gripe.

[4] La composición del punto [2], en la que el antígeno subunidad mencionado anteriormente comprende, como mínimo, un antígeno subunidad seleccionado del grupo que comprende HA y NA.

[5] La composición del punto [1], en la que el poli ($I:C_xU$) mencionado anteriormente es poli ($I:C_{12}U$).

[6] Una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de (i) un antígeno del virus de la gripe, (ii) poli (I:C), poli ($I:C_xU$) o poli ($I_xU:C$), y (iii) un polímero de carboxivinilo, en la que x es en promedio un número de 3 a 40, siendo dicha composición para utilizar en un procedimiento de prevención de la gripe, que comprende una etapa de administrar dicha composición, como mínimo, una vez a la mucosa nasal de un paciente con necesidad de la misma.

[7] La composición para la utilización, según el punto [6], en la que el antígeno mencionado anteriormente es un antígeno subunidad o un antígeno inactivado.

[8] La composición para la utilización, según el punto [7], en la que el antígeno subunidad mencionado anteriormente comprende, como mínimo, un antígeno subunidad seleccionado del grupo que comprende HA, NA, M1, M2, NP, PB1, PB2, PA y NS2 del virus de la gripe.

[9] La composición para la utilización, según el punto [7], en la que el antígeno subunidad mencionado anteriormente comprende, como mínimo, un antígeno subunidad seleccionado del grupo que comprende HA y NA.

[10] La composición para la utilización, según el punto [6], en la que el poli (I:C_xU) mencionado anteriormente es poli (I:C_{12}U).

[11] La composición para la utilización, según el punto [6], en la que el procedimiento mencionado anteriormente comprende administrar la composición, como mínimo, dos veces.

[12] La composición para la utilización, según el punto [11], en la que el procedimiento mencionado anteriormente comprende administrar la composición en un intervalo, como mínimo, de una semana.

Las características y las ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada de la presente invención a continuación.

Descripción breve de los dibujos

La figura 1 muestra la respuesta inmunitaria en una prueba de administración nasal de una vacuna contra la gripe que comprende Ampligen y una base CVP combinados.

La figura 2 es un diagrama de flujo de una prueba de inmunidad de ratón en el ejemplo 2.

La figura 3 es un resumen de la prueba de administración de la vacuna en el ejemplo 2.

La figura 4 es un diagrama de flujo de la prueba de inmunidad de mono en el ejemplo 3.

La figura 5 muestra los resultados de un ELISA de IgG en suero en el ejemplo 3.

La figura 6 muestra los resultados de un ELISA de IgA de un hisopo nasal en el ejemplo 3.

La figura 7 muestra un resumen de la prueba de administración de la vacuna en el ejemplo 3.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, el virus de la gripe incluye cualquier subtipo conocido en la actualidad, y los subtipos que se aislarán e identificarán en el futuro. Dado que hasta ahora no se han observado epidemias en seres humanos y la infección humana necesita evitarse de manera eficaz por adelantado, el virus de la gripe es, de manera preferente, un subtipo que consiste en una combinación de un tipo seleccionado entre H1-H16, excluyendo H1 y H3 (es decir, H2 y H4-16) y un tipo seleccionado entre N1-N9. Estos subtipos también son llamados nuevo tipo de virus de la gripe. El subtipo mencionado anteriormente es, de manera más preferente, un subtipo que consiste en una combinación de un tipo seleccionado entre H5, H7 y H9 y un tipo seleccionado entre N1-N9. El virus de la gripe puede ser un tipo de cepa perteneciente al mismo subtipo, o dos o más tipos de cepas que pertenecen al mismo subtipo, o dos o más tipos de cepas que pertenecen a diferentes subtipos.

El antígeno del virus de la gripe contenido en la composición de vacuna de la presente invención se divide, en general, en un antígeno inactivado y un antígeno subunidad.

La expresión "antígeno inactivado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un antígeno desprovisto de capacidad de infección, utilizado como un antígeno de vacuna; entre dichos antígenos se incluyen, pero sin limitación a los mismos, viriones de partículas de virus completas, partículas de virus incompletas, partículas que constituyen viriones, proteínas no estructurales de virus, antígenos que protegen contra las infecciones, epítopos neutralizantes de reacción y similares. La expresión "antígeno inactivado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un antígeno desprovisto de capacidad de infección, pero que conserva la inmunogenicidad; cuando dicho antígeno se utiliza como una vacuna, se denomina una "vacuna inactivada." Entre los ejemplos de los procedimientos de inactivación de antígenos se incluyen, pero sin limitación a los mismos, procedimientos físicos (por ejemplo, irradiación de rayos X, calor, ultrasonido), procedimientos químicos (formalina, mercurio, alcohol, cloro) u otros procedimientos. El antígeno subunidad *per se* también se encuentra dentro de la definición de antígeno inactivado porque, en general, han perdido capacidad de infección. De manera alternativa, también puede utilizarse un virus muerto.

La expresión "antígeno subunidad", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un componente derivado de un virus de la gripe. El antígeno subunidad incluye hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), matrices (M1, M2), no estructuras (NS), polimerasas (PB1, PB2: polimerasas básicas 1 y 2, polimerasa ácida (PA)), proteínas nucleares (NP) y similares, con preferencia por HA o NA, que está expuesto a la superficie de la partícula de virus. Los tipos actualmente conocidos de HA son de HA1 a HA16 y los tipos conocidos de NA son de NA1 a NA9. El antígeno subunidad se puede purificar a partir de un patógeno, tal como un virus de origen natural, o se puede preparar mediante una tecnología sintética o recombinante. Dichos procedimientos son bien conocidos y se utilizan habitualmente en la técnica, y se pueden realizar utilizando equipos, reactivos, vectores y similares disponibles comercialmente.

La cantidad de antígeno del virus de la gripe que debe contener la composición de vacuna de la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando sea suficiente para producir IgA secretora, y pueda determinarse de manera apropiada al considerar la proporción con respecto al poli (I:C) mencionado a continuación o un derivado del mismo. Cuando se utiliza HA como antígeno, por ejemplo, su concentración es, de manera preferente, 10-500 µg HA/ml (basándose en HA), de manera más preferente, 30-400 µg HA/ml (basándose en HA). La concentración mencionada anteriormente se obtiene mediante la medición de la concentración de proteína HA.

El poli (I:C) tal como se encuentra en la composición de vacuna de la presente invención es un ARN de doble cadena (dsARN) que comprende ácido poliinosínico (pI) y ácido policitídico (pC).

Un derivado de poli (I:C) es poli ($I:C_xU$) o poli ($I_xU:C$) (en el que X es de promedio un número de 3 a 40). De manera preferente, un derivado de poli (I:C) es poli ($I:C_{12}U$) o poli ($C:I_{12}U$), que está disponible comercialmente bajo el nombre comercial Ampligen®.

Poli (I:C) o un derivado del mismo se suministra en un tamaño suficiente para producir IgA secretora. Entre los ejemplos de dichos tamaños se incluyen 100 pb o más, con preferencia a los tamaños de 300 pb o más, cuyos tamaños, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes. Entre los ejemplos del límite superior del tamaño se incluye, pero sin limitación al mismo, 10^8 pb.

Poli (I:C) o un derivado del mismo está presente a una concentración suficiente para producir IgA secretora. Dicha concentración de poli (I:C) o un derivado del mismo es, por ejemplo, de 0,1 a 10 mg/ml, de manera más preferente, de 0,5 a 2 mg/ml y, de manera aún más preferente, aproximadamente 1 mg/ml (por ejemplo, de 0,8 a 1,2 mg/ml).

La proporción en peso de antígeno del virus de la gripe y poli (I:C) o un derivado del mismo que debe contener la composición de vacuna de la presente invención se recomienda que sea 1:1-1:50.

Un polímero de carboxivinilo (CVP) contenido en la composición de vacuna de la presente invención es un polímero hidrófilo que se produce mediante la polimerización de ácido acrílico, como el componente monomérico principal, e incluye los polímeros de carboxivinilo convencionales, tales como Carbopol®, disponible comercialmente de Lubrizol Advanced Materials, Inc. US, y similares. La concentración de CVP utilizada en la presente invención se encuentra, en general, en el intervalo del 0,1 al 2,0% en peso.

La composición de vacuna de la presente invención puede contener una sustancia básica soluble en agua con el fin de espesar el CVP. La sustancia básica soluble en agua incluye, por ejemplo, bases inorgánicas (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco, etc.) y bases orgánicas, tales como alquilaminas (por ejemplo, metilamina, etilamina, propilamina, etc.), dialquilaminas (por ejemplo, dimetilamina, dietilamina, dipropilamina, etc.), trialquilaminas (por ejemplo, trimetilamina, trietilamina, tripropilamina, etc.), alcanolaminas (por ejemplo, metanolamina, etanolamina, propanolamina, etc.), dialcanolaminas (por ejemplo, dimetanolamina, dietanolamina, dipropanolamina, etc.), trialcanolaminas (por ejemplo, trimetanolamina, trietanolamina, tripropanolamina, etc.), aminoácidos (por ejemplo, arginina, lisina, ornitina, etc.) y similares. Estas bases solubles en agua se utilizan en una cantidad que es necesaria para la neutralización para ajustar el valor de pH de la solución acuosa de CVP a un pH deseado.

El valor de pH de la composición de vacuna de la presente invención se ajusta al pH deseado con una sustancia básica soluble en agua o con otros ajustadores de pH, teniendo en cuenta la estabilidad o la absorción del antígeno del virus de la gripe. El intervalo de pH preferente es de 6,0-8,0.

El ajuste de la viscosidad se puede realizar dependiendo de la forma de dosificación de la vacuna. Por ejemplo, el CVP correspondiente al 0,1-2,0% en peso se espesa con una sustancia básica soluble en agua y la viscosidad se ajusta mediante la aplicación de una fuerza de cizalla exterior, o se ajusta con un agente modulador de la viscosidad y una fuerza de cizalla exterior, mediante lo cual se prepara una base dispuesta para ser adecuada para el ángulo de pulverización y la densidad de pulverización de un pulverizador. A continuación, se mezclan el antígeno del virus de la gripe y el poli (I:C).

La composición de vacuna de la presente invención puede contener un medicamento activo, diluyente, bactericida, conservante, surfactante, estabilizador adecuados, y similares, que pueden utilizarse junto con la vacuna.

La presente invención se refiere a un procedimiento de prevención de la gripe, que comprende una etapa de administrar una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de un antígeno del virus de la gripe y poli (I:C) o un derivado del mismo, y un polímero de carboxivinilo, como mínimo, una vez a través de la mucosa nasal de un paciente con necesidad de la misma.

Entre los individuos de administración de la composición de vacuna de la presente invención se incluyen, pero sin limitación a los mismos, mamíferos, incluyendo humanos, aves y similares.

La administración a través de la mucosa nasal de la composición de vacuna se puede realizar en una forma apropiada. Se pueden utilizar varios procedimientos, tales como pulverización, recubrimiento o goteo directo de una vacuna líquida.

La frecuencia de administración de la composición de vacuna de la presente invención es, como mínimo, una vez, de manera preferente, como mínimo, dos veces, según la eficacia. La administración adicional a veces se denomina inmunización de refuerzo. La inmunización de refuerzo permite conseguir un mayor efecto de protección frente a la infección. El intervalo de inmunización de refuerzo recomendado es, como mínimo, de 1 semana, de manera preferente, de 1 a 4 semanas.

La presente invención se describe a continuación con más detalle mediante los siguientes ejemplos, que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

(Ejemplo 1)

Prueba de administración nasal de la vacuna de virión completo que contiene Ampligen y CVP combinados para el nuevo tipo de gripe utilizando un ratón.

En el desarrollo de una vacuna contra la gripe para la administración nasal, es muy importante y muy urgente una vacuna correspondiente a la gripe pandémica, en comparación con una vacuna para la gripe estacional, y necesita ser desarrollada de manera preferente. Por lo tanto, se preparó una vacuna de muestra que contenía una vacuna para el nuevo tipo de gripe (cepa PR8-IBCDC-RG2: cepa del virus atenuado de A/Indo/5/2005 (H5N1)) y Ampligen en una cantidad de 10 veces de antígeno HA, de la misma manera que para la vacuna de HA de la gripe estacional. La vacuna de muestra contenía, como aditivo para aumentar la respuesta inmunitaria en la mucosa nasal mediante el retraso de la depuración de la vacuna de la mucosa nasal, una base de CVP [mezcla de CVP al 0,55%, L-arginina al 1,2%, glicerina al 1%] también aplicada a medicamentos para la alergia.

Para una prueba de administración nasal, se utilizaron ratones BALB/c hembras de 7 semanas de vida (5 por grupo) y se administró el antígeno a 0,033-1 µg HA/cabeza. Como control de comparación, se prepararon un grupo para el que se añadió Ampligen a la vacuna en una cantidad de 10 veces de antígeno HA y no se añadió base de CVP, un grupo para el que se añadió Ampligen a la vacuna en una cantidad de 20 veces de antígeno HA y no se añadió base de CVP, un grupo para el que se añadió CVP solo a la vacuna, un grupo al que la vacuna sin adición se administró por vía nasal y un grupo al que la vacuna sin adición se administró por vía intramuscular. La vacuna se administró dos veces en intervalos de 3 semanas, y se recuperaron los lavados nasales y el suero 2 semanas después de la dosis de refuerzo. Se midió el título de anticuerpo específico en ELISA específico de IgA de los lavados nasales y se midieron los títulos de anticuerpo de la inhibición de la hemaglutinación (HI), anticuerpo neutralizante y ELISA específico de IgG del suero. Dado que la vacuna de muestra presentaba una alta viscosidad, el procedimiento de administración se cambió de goteo nasal convencional utilizando una micropipeta a inyección mediante la inserción de aproximadamente 4 mm de una aguja de punta roma (27G, 0,4 mm x 38 mm) fijada a una microjeringa.

Los resultados se muestran en las tablas 1-9.

[Tabla 1]

Vacuna de HA A/Hiroshima + poli (I:C) o Ampligen (grupo de comparación)

grupo	antígeno	vía de administración	dosis	números/grupo	antígeno (µg de HA o ptn)	Poli (I:C)	Ampligen (nuevo)
1	Vacuna de HA A/Hiroshima/52/2005 (H3N2)	in	2 µl en cada cavidad nasal	5	0,1		
2					0,1	0,1	
3					0,1	1	
4			2,7 µl en cada cavidad nasal		0,1	10	
5					0,1		0,1
6					0,1		1
7					0,1		10
8		sc	100		0,1		
9	virión completo	in			0,2		
10	ninguno (control)			10			

1º: 1/28 ratones Balb/c (hembras de 7 semanas de vida)
2º: 2/18
Muestreo: 2/28
El antígeno fue la vacuna de HA A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) FTHAG0712 (1205 µg HA/ml) o la vacuna de virión completo (344 µg ptn/ml)
poli (I:C) [SIGMA P-0913] se ajustó a 1,88 mg/ml
Ampligen (nuevo) fue Lot0701HE

[Tabla 2]

Vacuna de HA A/Hiroshima experimental + poli (I:C) o Ampligen en lavado nasal (LN) de IgA de ELISA

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
antígeno		vacuna HA A/Hiroshima/52/2005 (H3N2)								virión completo	ninguno (control)
vía de administración		in							sc	in	
dosis		2 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)			2,7 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)	2 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)			100 µl	2 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)	
números/grupo		5									10
antígeno (µg de HA o ptn)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	
adyuvante (µg/cabeza)	Poli (I:C)		0,1	1	10						
	Ampligen (nuevo)					0,1	1	10			
No. de animal	1	1	1	1	16	1	1	128	1	64	1
	2	1	32	16	16	128	4	32	1	8	1
	3	1	2	16	128	32	32	4	1	8	1
	4	1	16	32	256	32	8	16	1	32	1
	5	1	64	32	64	2	2	16	1	32	1
media geométrica		1,0	9,2	12,1	55,7	12,1	4,6	21,1	1,0	21,1	1,0
SD		0,0	26,2	13,0	100,6	52,0	12,9	50,6	0,0	23,0	0,0
media geométrica del título (GMT, 2^n)		0,0	3,2	3,6	5,8	3,6	2,2	4,4	0,0	4,4	0,0
tasa de conversión positiva (≥32%)		0,0	40,0	40,0	60,0	60,0	20,0	40,0	0,0	60,0	0,0

[Tabla 3]

Vacuna de HA A/Hiroshima experimental + poli (I:C) o Ampligen IgG en suero

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
antígeno		vacuna HA A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) FTHAG0712								virión completo	ninguno (control)
vía de administración		in							sc	in	
dosis		2 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)			2,7 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)	2 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)			100 µl	2 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)	
números/grupo		5									10
antígeno (µg de HA o ptn)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	
	Poli (I:C)		0,1	1	10						
	Ampligen (nuevo)					0,1	1	10			
No. de animal	1	50	50	100	6.400	100	50	1.600	51.200	1.600	50
	2	50	800	200	400	400	400	800	51.200	400	50
	3	50	400	1.600	6.400	6.400	1.600	100	51.200	200	50
	4	50	200	800	3.200	200	6.400	50	25.600	400	100
	5	50	400	400	800	200	50	800	25.600	1.600	50
media geométrica		50,0	263,9	400,0	2.111,2	400,0	400,0	348,2	38.802,3	606,3	53,6
SD		0,0	282,0	609,9	2.906,5	2763,7	2.703,5	634,0	14.021,7	698,6	15,8
media geométrica del título (GMT, 2^n)		5,6	8,0	8,6	11,0	8,6	8,6	8,4	15,2	9,2	5,7

[Tabla 4]

Vacuna de HA A/Hiroshima experimental + poli (I:C) o Ampligen de HI en suero

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
antígeno		vacuna Ha A/Hiroshima /52/2005								virión completo	ninguno (control)
vía de administración		in							sc	in	
dosis		2 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)			2,7 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)	2 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)			100 µl	2 µl en cada fosa nasal (cavidad nasal)	
números/grupo		5									10
antígeno (µg de HA o ptn)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	
	Poli (I:C)		0,1	1	10						
	Ampligen (nuevo)					0,1	1	10			
No. de animal	1	5	5	5	40	5	5	5	160	5	5
	2	5	5	5	5	5	5	5	320	5	5
	3	5	5	5	40	5	5	5	320	5	5
	4	5	5	5	20	5	10	5	160	5	5
	5	5	5	5	5	5	10	5	80	5	5
media geométrica		5,0	5,0	5,0	15,2	5,0	6,6	5,0	183,8	5,0	5,0
SD		0,0	0,0	0,0	17,5	0,0	2,7	0,0	107,3	0,0	0,0
media geométrica del título (GMT, 2^n)		2,3	2,3	2,3	3,9	2,3	2,7	2,3	7,5	2,3	2,3
tasa de seroconversión (≥40%)		0,0	0,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	100,00	0,0	0,0

[Tabla 5]

Prueba preliminar del efecto farmacológico del Ampligen: virión completo de H5 de Indonesia (25/09/2008) constitución del grupo de prueba

grupo	antígeno (µg/dosis)	Ampligen (µg/dosis)	CVP (%)	n	vía de administración	dosis (µl)	nota
1	0,3	3,00		5	in	2,0	antígeno: Ampligen = 1:10
2	0,1	1,00		5	in	2,0	
3	0,033	0,33		5	in	2,0	
4	0,3	3,00	0,55	5	in	2,0	antígeno: Ampligen = 1:10 + CVP
5	0,1	1,00	0,55	5	in	2,0	
6	0,033	0,33	0,55	5	in	2,0	
7	0,3	6,00		5	in	2,0	antígeno: Ampligen = 1:10
8	0,1	2,00		5	in	2,0	
9	0,033	0,67		5	in	2,0	
10	0,3		0,55	5	in	2,0	antígeno + CVP
11	0,1		0,55	5	in	2,0	
12	0,033		0,55	5	in	2,0	
13	0,3			5	in	2,0	antígeno solo
14	0,1			5	in	2,0	
15	0,033			5	in	2,0	
16	0,3			5	in	50,0	antígeno solo, control intramuscular
17				10	in	2,0	control de solución salina

30/09/2008 Primera inmunización
21/10/2008 Segunda inmunización
04/11/2008 Muestreo
El antígeno era la cepa del virus atenuado de PR8-IBCDC-RG2
cepa: A/Indo/5/2005 (H5N1), Lote FPBMW0612-0 3.110 µg PTN/ml. Aproximadamente 1.048 µg HA/ml))
Ampligen está fabricado por Hemispherx, Lote R-01: 45,7 mg/ml
El CVP está fabricado por Toko Yakuhin Kogyo, Lote No. INF-9B8, la base para la preparación (# 03-01)
Nota 1: preparado para 300 ratones
antígeno: 300 ratones x 0,3 µg/cabeza/1,048 µg/µl = 85,9 µl
Se utilizaron ratones BALB/c hembra de 7 semanas de vida.

[Tabla 6]

Prueba preliminar del efecto farmacológico de Ampligen: virión completo de H5 de Indonesia (25/09/2008)
IgA en lavado nasal (LN) (06/11/2008)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
antígeno (µg/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	
Ampligen (µg/dosis)		3,00	1,00	0,33	3,00	1,00	0,33	6,00	2,00	0,67								
CVP (%)					0,55	0,55	0,55				0,55	0,55	0,55					
vía de administración		in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	im	in
No. de animal	1	32	32	4	256	128	16	8	8	4	16	32	8	16	16	1	1	1
	2	16	16	8	512	128	6	32	4	4	32	2	2	4	8	8	1	1
	3	32	32	4	128	128	2	16	8	2	16	2	1	16	2	4	1	2
	4	16	16	2	64	512	64	32	32	2	64	2	2	8	4	16	2	2
	5	8	32	1	64	64	64	64	8	8	4	1	4	8	64	2	2	2
media geométrica del título (GMT)		18,4	24,3	3,0	147,0	147,0	18,4	24,3	9,2	3,5	18,4	3,0	2,6	9,2	9,2	4,0	1,3	1,5
título promedio (2^n)		4.2	4,6	1,6	7,2	7,2	4,2	4,6	3,2	1,8	4,2	1,6	1,4	3,2	3,2	2,0	0,4	0,6
proporción de conversión positiva (título ≥ 32%)		40	60	0	100	100	40	60	20	0	40	20	0	0	20	0	0	0

[Tabla 7]

Prueba preliminar del efecto farmacológico del Ampligen: virión completo de H5 de Indonesia (25/09/2008)
NT en suero (19/11/2008)

grupo		4	5	6	13	16
antígeno (µg/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,3
Ampligen (µg/dosis)		3,00	1,00	0,33		
CVP (%)		0,55	0,55	0,55		
Poli L-Arg (µg/dosis)						
vía de administración		in	in	in	in	im
No. de animal	1	80	160	80	20	160
	2	1.280	10	40	10	80
	3	80	160	40	10	320
	4	160	160	160	10	80
	5	160	160	40	10	640
media geométrica del título (GMT)		183,8	91,9	60,6	11,5	183,8
título promedio (2^n)		7,5	6,5	5,9	3,5	7,5

[Tabla 8]

Prueba preliminar del efecto farmacológico de Ampligen: virión completo de H5 de Indonesia (25/09/2008)
Hi en suero (11/2008)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
antígeno (µg/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	
Ampligen (µg/dosis)		3,00	1,00	0,33	3,00	1,00	0,33	6,00	2,00	0,67								
CVP (%)					0,55	0,55	0,55				0,55	0,55	0,55					
vía de administración		in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	im	in
No. de animal	1	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	5
	2	5	5	5	40	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	5
	4	5	5	5	10	10	20	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	5	5	5	10	5
media geométrica del título (GMT)		5,0	5,0	5,0	8,7	6,6	6,6	6,6	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	8,7	5,0
título promedio (2^n)		2,3	2,3	2,3	3,1	2,7	2,7	2,7	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	3,1	2,3
tasa de seroconversión (≥ 40%)		0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[Tabla 9]

Prueba preliminar del efecto farmacológico de Ampligen: virión completo de H5 de Indonesia (25/09/2008)
IgG en suero (06/11/2008)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
antígeno (µg/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	
Ampligen (µg/dosis)		3,00	1,00	0,33	3,00	1,00	0,33	6,00	2,00	0,67								
CVP (%)					0,55	0,55	0,55				0,55	0,55	0,55					
vía de administración		in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	im	in
No. de animal	1	1.600	1.600	400	12.800	6.400	1.600	6.400	200	50	800	400	400	1.600	200	50	12.800	50
	2	1.600	1.600	400	51.200	6.400	800	6.400	800	800	6.400	50	50	3.200	3.200	200	12.800	50
	3	800	800	200	6.400	12.800	1.600	6.400	800	100	51.200	50	100	1.600	50	200	25.600	50
	4	800	400	200	6.400	25.600	3.200	6.400	1.600	100	800	200	100	3.200	1.600	400	12.800	50
	5	800	400	200	12.800	12.800	3.200	12.800	800	1.600	800	100	200	1.600	3.200	50	12.800	50
media geométrica del título (GMT)		1.055,6	800,0	263,9	12.800,0	11.143,0	1.837,9	7.351,7	696,4	229,7	2.785,8	114,9	132,0	2.111,2	696,4	132,0	14.703,3	50,0
título promedio (2^n)		10,0	9,6	8,0	13,6	13,4	10,8	12,8	9,4	7,8	11,4	6,8	7,0	11,0	9,4	7,0	13,8	5,6
proporción de conversión positiva (título ≥ 32%)		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	200

(Resultados)

Prueba de administración nasal de la vacuna de virión completo para el nuevo tipo de gripe, que contiene Ampligen y la base de CVP combinados, y utilizando un ratón.

Se confirmó un efecto inmunopotenciador destacable en la mucosa y en suero en el grupo administrado con una vacuna que contenía Ampligen y una base de CVP combinados, que no se encontró en el grupo administrado con Ampligen solo. El título de anticuerpos específicos de IgG, HI y neutralizantes (NT) del suero aumentó hasta niveles equivalentes a los del grupo de inyección intramuscular (sin adyuvante).

Se preparó una vacuna contra la gripe pandémica de muestra que contenía, como aditivo para aumentar la respuesta inmunitaria en la mucosa nasal, una base de CVP también aplicada combinada a medicamentos para la alergia, y se utilizó para una prueba de administración nasal.

Los presentes inventores investigaron la conveniencia del procedimiento de administración nasal en este punto y se obtuvieron efectos inesperados de una respuesta inmunitaria notablemente aumentada de la mucosa nasal, un título de anticuerpos específicos del suero, que es equivalente al de la inyección intramuscular sin adyuvante, y similares. Por lo tanto, se obtuvo una vacuna más práctica.

(Ejemplo 2)

Sistema de evaluación a través de la inmunidad transnasal en ratón (consideración de la dosis óptima y la frecuencia de administración para el ratón)

Se examinaron la dosis y frecuencia de administración óptimas para el ratón basándose en las mediciones en suero del título de anticuerpos específicos de IgG y del título de anticuerpos para HI después de la adición de Ampligen, CVP y similares, a un antígeno, y la comparación con las vacunas existentes que tienen una composición conocida y una vía de administración conocida, y utilizando un "antígeno del nuevo tipo de virus de la gripe a concentración elevada".

(Materiales)

1. Solución madre de la vacuna contra el nuevo tipo de gripe y virus para la evaluación del título de anticuerpos de reacción cruzada:

Solución madre de la vacuna contra el nuevo tipo de gripe: No. de lote: FPBMW0612-c
(concentración de proteína: 3110 µg/ml, contenido de HA 992 µg HA/ml, cepa del virus de origen: A/Indo/5/2005 (H5N1)/PR8-IBCDC-RG2) ("Instituto de investigación de enfermedades microbianas" ("The Research Foundation for Microbial Diseases") de la universidad de Osaka)

2. Cepa original del virus y antígeno de vacuna inactivado:
para la medición del título de anticuerpos específicos:

cepa A/Indo/5/2005 (H5Nl)/PR8-IBCDC-RG2: cepa atenuada (clado 2.1) de A/Indonesia/5/2005 (H5N1)
para la medición del título de anticuerpos de reacción cruzada:
cepa A/Anhui/01/2005 (H5Nl)/PR8-IBCDC-RG5 cepa: cepa atenuada (clado 2.3) de A/Anhui/01/2005 (H5N1)
cepa A/ánsar indio/Qinghai/1A/2005: cepa atenuada (clado 2.2) de A/Qinghai/1A/2005 (H5N1)
cepa NIBRG-14: cepa atenuada (clado 1) de A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)

3. Adyuvante:

Ampligen®: que contiene Ampligen (2,5 mg/ml) fabricado por Hemispherx

4. Procedimiento de prueba

La figura 2 muestra una vista esquemática de los diagramas de flujo de la prueba.

Se administró por vía transnasal una vacuna que contenía el antígeno del virus A/Indo/5/2005 (H5N1)/PR8-IBCDC-RG2 (obtenida mediante la adición de Ampligen a una concentración de 20 veces de antígeno HA y la adición de base de CVP (polímero de carboxivinilo al 1,1%, L-arginina al 2,4%, glicerol al 2,0%) hasta el 50,0% v/v de la cantidad total) a ratones BALB/c y se tomaron muestras (frotis nasal y suero) 3 semanas más tarde. En este caso, las muestras no se tomaron de una parte de los ratones y se administró una dosis de refuerzo a los mismos de una a tres veces. El intervalo entre las dosis de refuerzo para los ratones sometidos a dosis de refuerzo dos o tres veces fue de 2 semanas. Se tomaron muestras a las 2 semanas desde de la última dosis de refuerzo y se confirmó la respuesta inmunitaria cuando se tomaron todas las muestras. Como controles de comparación para la confirmación de los efectos de Ampligen y de la base de CVP añadidos, se estableció un grupo de administración

transnasal de una vacuna sin adición (dosis alta, dosis media, dosis baja) con la misma dosis de antígeno, pero libre de Ampligen y base de CVP y un grupo de control negativo (administración transnasal (una vez) de solución salina), y se estableció un grupo de administración intramuscular de una vacuna sin adición (dosis alta) para la comparación con vacunas que tienen una forma de dosificación conocida y una vía de administración conocida. A partir de la prueba mencionada anteriormente, se evaluó la relación entre la dosis y la frecuencia de administración, y la respuesta inmunitaria. Además, también se investigó la respuesta inmunitaria con una cepa de virus que tenía diferente antigenicidad para obtener resultados en cuanto a la reactividad cruzada.

5. Animales y vacuna (tabla 10)

animales de prueba: ratón BALB/c (hembra, 6 semanas de vida cuando se inició la prueba), 10 ratones/grupo
vacuna experimental para considerar en una prueba y dosis de adyuvante:
grupo de dosis alta: [0,3 μg de HA + 6 μg de Ampligen]/dosis
grupo de dosis media: [0,1 μg de HA + 2 μg de Ampligen]/dosis
grupo de dosis baja: [0,033 μg de HA + 0,66 μg de Ampligen]/dosis

Como control negativo, se estableció un grupo de administración de solución salina. Además, para la confirmación de los efectos de la adición de la vacuna, se estableció un grupo de administración transnasal de una vacuna sin adición (dosis alta, dosis media, dosis baja) con la misma dosis de antígeno, pero libre de Ampligen y base de CVP, y se estableció un grupo de administración intramuscular (dosis alta) para la comparación con las vacunas convencionales (forma de dosificación y vía de administración conocidos).

composición de la vacuna:
grupo de dosis alta: [0,3 μl de vacuna + 2,4 μl de Ampligen + 2,5 μl de base de CVP]/dosis
grupo de dosis media: [0,1 μl de vacuna + 0,8 μl de Ampligen + 1,6 μl de M/75 PBS (pH 7,2) + 2,5 μl de base de CVP]/dosis
grupo de dosis baja: [0,033 μl de vacuna + 0,26 μl de Ampligen + 2,207 μl de M/75 PBS (pH 7,2) + 2,5 μl de base de CVP]/dosis

La vacuna para la administración transnasal sin adición utilizada como control negativo se obtuvo mediante la eliminación de Ampligen y la base de CVP de la composición mencionada anteriormente, y la adición de M/75 PBS (pH 7,2) en un volumen correspondiente a la misma. Además, la vacuna para la administración intramuscular sin adición era [0,3 μl de vacuna + 49,7 μl de M/75 PBS (pH 7,2)]/dosis.

volumen de administración de la vacuna: (tabla 11)

El grupo de administración transnasal fue administrado con 6 μl en una fosa nasal, y el grupo de administración subcutánea de vacuna sin adición fue administrado con 50 μl en el área femoral unilateral.

6. Elementos de medición (tablas 12-19)

frotis nasal: título de anticuerpos específicos de IgA en ELISA y título de anticuerpos en ELISA IgG de reactividad cruzada:
se midieron el títulos de anticuerpos específicos de IgG en ELISA en suero, título de anticuerpos específicos de HI (inhibición de la hemaglutinación) y título de anticuerpos de HI de reactividad cruzada, título de anticuerpos neutralizantes específicos y título de anticuerpos neutralizantes de reactividad cruzada. Entre los elementos de medición mencionados anteriormente, el resumen del procedimiento de medición de los títulos de anticuerpos en ELISA fue tal como se describe a continuación.

El antígeno de la vacuna (diluido con tampón carbonato 100 mM (pH 9,6) hasta una concentración de proteína de 1 μg/ml) se dispuso en fase sólida (4ºC, durante la noche) sobre una placa de 96 pocillos para ELISA a 100 μl/pocillo, y se lavó 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Se añadió una muestra diluida 2 veces en serie o un control negativo a 100 μl/pocillo. A continuación, la placa se incubó a 37ºC durante 1 hora y se lavó 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Se añadió un anticuerpo para la detección (IgG contra ratón marcada con fosfatasa alcalina o IgA contra ratón marcada con biotina) a 100 μl/pocillo. La placa se incubó a 37ºC durante 1 hora y se lavó 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1% (para la detección de IgA se añadió estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina a 100 μl/pocillo, se incubó a 37ºC durante 1 hora y se lavó 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%). A continuación, se añadió 4-nitrofenilfosfato (1 mg/ml, diluido con dietanolamina 0,1 M (pH 9,8)) a 100 μl/pocillo y se protegió la placa de la luz solar. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 min, se midió la absorbancia a 405 nm.

La tasa de dilución máxima que permite una absorbancia de la muestra superior a la absorbancia promedio del control negativo + 2SD se tomó como el título de anticuerpos de la muestra. Para el título de anticuerpos específicos, se utilizó la misma cepa que el antígeno de la vacuna de administración, para el título de anticuerpos de reactividad

cruzada, se utilizó un antígeno de vacuna de una cepa diferente. A continuación, se midieron de la misma manera el título de anticuerpos neutralizantes de HI.

Título de anticuerpos específicos de HI (inhibición de la hemaglutinación) y título de anticuerpos de HI de reactividad cruzada:

La prueba se realizó según la descripción en el "Manual para la detección de patógenos" (editado por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas). Los glóbulos rojos utilizados derivaban de pollo.

Título de anticuerpos neutralizantes específicos y título de anticuerpos neutralizantes de reactividad cruzada:

La prueba se realizó según la descripción en el "Manual para la detección de patógenos" (editado por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas). El cultivo después de la infección del virus se llevó a cabo durante 4 días. Además, se utilizó un procedimiento que comprende teñir las células con azul negro de naftol al 0,1%/acetato de sodio al 0,1%/ácido acético al 9%, secar la placa de cultivo celular, añadir hidróxido de sodio 0,1 M y medir la absorbancia a 630 nm para la distinción entre células infecciosas y células no infecciosas del virus.

(Resultados)

Se utilizaron ratones BALB/c (hembra, 6,5 semanas de vida cuando se inició la prueba) y se examinó la respuesta inmunitaria cuando se administró por vía transnasal de 1 a 4 veces el antígeno (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)) suplementado con ampligen a una proporción de 20 veces de antígeno HA y CVP, utilizando como control de comparación un grupo de administración transnasal de antígeno + Ampligen + CVP para la primera mitad del grupo de prueba y administración transnasal del antígeno solo/administración intramuscular de antígeno solo/administración transnasal de solución salina para la segunda mitad. Los resultados se muestran en las tablas 12-19 y la figura 3.

En el grupo de antígeno + Ampligen + CVP, se observaron de varias a una docena de veces los títulos de anticuerpo de IgG y NT en suero/IgA en membrana de mucosa en comparación con el grupo de administración transnasal de antígeno solo, y la diferencia era destacable en los grupos con una dosis más baja y una menor frecuencia de administración.

El conocimiento común convencional sostiene que, en comparación con las vacunas para administración subcutánea o intramuscular, las vacunas del tipo de administración transnasal muestran menos títulos de anticuerpos neutralizantes específicos, títulos de anticuerpos específicos de IgG en suero y títulos de anticuerpos de HI. Sin embargo, se descubrió que la vacuna evaluada en este documento conseguía títulos de anticuerpos neutralizantes específicos, títulos de anticuerpos específicos de IgG en suero y títulos de anticuerpos de HI equivalentes o superior a los de las vacunas con una composición y vía de administración convencionales, mediante la adición de Ampligen® y similares.

Además, se examinó la respuesta inmunitaria de las muestras obtenidas mediante esta prueba con la misma cepa que el antígeno administrado y una cepa con diferente antigenicidad para confirmar la reactividad cruzada.

[Tabla 10]

Vacuna contra la gripe del nuevo tipo A/Indo con adición de Ampligen y CVP; consideración de la frecuencia de administración de la dosis en ratón; prueba NT en suero (24/08/2009, 27/08/2009) reacción cruzada (A/VN)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
cantidad de antígeno administrado (µg de HA/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,3	0,3	0,3	ninguna (solución salina)
frecuencia de administración		4			3			2			1			4			3			2			1			4	3	2	1	1
vía de administración		trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	trans nasal
adición de adyuvante (Ampligen), CVP		sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	ninguno	ningu-no	ninguno	ninguno	ningu -no	ninguno	ninguno	ningu no	ninguno	ningu no	ninguno	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ninguno
No. de animal	1	40	20	10	40	160	40	5	40	40	80	80	40	10	40	10	40	40	40	20	40	40	40	20	40	80	20	80	80	40
	2	20	40	40	80	20	80	10	80	20	80	80	40	40	5	20	40	40	40	40	20	40	20	40	40	20	40	80	40	80
	3	40	40	10	40	40	160	20	80	20	80	40	20	40	20	20	40	20	40	20	40	20	40	40	40	80	40	80	40	40
	4	160	40	80	40	10	40	10	40	40	80	40	40	10	80	10	20	40	40	40	5	40	40	80	40	80	160	40	5	10
	5	80	20	20	40	80	40	40	10	40	80	40	40	10	20	20	80	40	40	40	40	40	20	20	40	20	80	40	40	5
	6	10	80	10	20	40	20	20	40	40	80	20	10	10	20	20	80	20	40	20	40	20	20	40	40	40	80	40	40	5
	7	20	10	10	40.	40	80	40	40	40	80	10	40	10	20	5	40	40	40	20	40	20	40	20	40	40	40	40	40	20
	8	40	10	20	80	40	40	10	40	40	80	40	5	20	20	10	20	20	40	20	10	20	40	40	40	160	80	40	10	40
	9	40		20	40	80	20	80	40	40	80	40	5	20	20	5	20	40	40	40	40	20	20	20	20	20	80	40	80	20
	10	20		80	80					80	80	40	40	40	20	20	80		40	5	40	40	40	40	10	20	80	40	40	20
título promedio de anticuerpo (GMT)		34,8	25,9	21,4	45,9	43,2	46,7	18,5	40,0	37,3	80,0	37,3	21,4	17,4	21,4	12,3	40,0	31,7	40,0	23,0	26,4	28,3	30,3	32,5	32,5	42,9	60,6	40,0	32,5	20,0
varianza		44,2	23,1	27,9	21,6	45,3	44,1	24,0	21,9	16,3	0,0	22,1	16,0	13,7	20,6	6,6	25,0	10,0	0,0	12,5	14,2	10,5	10,3	18,4	10,8	45,0	39,2	19,3	24,3	22,9

[Tabla 11]

Composición de vacuna

dosis	grupo de administración	solución madre de la vacuna (µl)	Ampligen (µl)	CVP (µl)	PBS M/75 (pH 7,2) (µl)	total (ml)	nota
dosis alta (0,3 µg de HA/dosis)	1, 4, 7, 10	302,42	2.400,0	3.000	297,58	6	para 1.000 veces (transnasal)
dosis moderada (0,1 µg de HA/dosis)	2, 5, 8, 11	100,81	800,0	3.000	2.099,19	6	para 1.000 veces (transnasal)
dosis baja (0,033 µg de HA/dosis)	3, 6, 9, 12	33,27	264,0	3.000	2.702,73	6	para 1.000 veces (transnasal)
dosis alta (0,3 µg de HA/dosis)	13, 16, 19, 22	302,42			5.697,58	6	para 1.000 veces (transnasal)
dosis moderada (0,1 µg de HA/dosis)	14, 17, 20, 23	100,81			5.899,19	6	para 1.000 veces (transnasal)
dosis baja (0,033 µg de HA/dosis)	15, 18, 21, 24	33,27			5.966,73	6	para 1.000 veces (transnasal)
dosis alta (0,3 µg de HA/dosis)	25, 26, 27, 28	30,24			4.969,76	5	para 100 veces (inyección intramuscular)
solución salina	29				600 (solución salina)		para 100 veces (transnasal)

Vacuna contra la gripe de partículas completas: A/Indo/5/2005 (H5N1) No. de lote FPBMW0612-c
(concentración de proteína: 3.110 µg/ml, contenido de HA 992 µg de HA/ml)
Ampligen (fabricado por Hemispherx): lote 0701HE (que contiene 2,5 mg/ml de Ampligen)
Base de CVP (fabricado por Toko Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisya): lote INF-N28; polímero de carboxivinilo al 1,1%, L-arginina al 2,4%, glicerol al 2%

[Tabla 12]

Vacuna contra la gripe del nuevo tipo A/Indo con adición de Ampligen y CVP; consideración de la frecuencia de administración de la dosis en ratón; Prueba ELISA de IgA del lavado nasal (19/06/2009-07/07/2009)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
cantidad de antígeno administrado (µg de HA/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,3	0,3	0,3	ninguna (solución salina)
frecuencia de administración		4			3			2			1			4			3			2			1			4	3	2	1	1
vía de administración		trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	transnasal
adición de adjuvante (Ampligen), CVP		sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	ninguno	ninguno	ninguno	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ninguno	ninguno	ningu no	ninguno	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ninguno
No. de animal	1	512	512	512	256	512	128	1024	512	512	128	1	8	512	512	128	256	64	64	1024	256	256	64	1	2	8	2	1	1	1
	2	512	512	512	256	512	512	4096	512	256	128	64	2	256	1024	64	128	64	128	256	128	32	32	2	2	2	2	2	1	1
	3	512	1024	256	256	512	512	4096	10124	512	128	4	4	512	128	128	128	32	256	512	16	32	323	2	2	2	2	2	1	1
	4	512	512	512	2048	512	512	2048	1024	128	128	16	4	512	512	64	512	64	64	1024	128	8	32	2	2	2	2	1	1	1
	5	512	512	512	512	512	512	1024	1024	256	256	64	4	256	128	64	512	64	32	512	128	32	8	1	2	2	2	1	1	1
	6	512	512	1024	1024	512	128	2048	512	512	32	1	64	512	512	64	256	128	64	512	64	16	8	8	4	1	2	2	1	1
	7	512	1024	512	128	512	512	2048	512	1024	128	8	4	256	128	64	128	64	64	64	16	128	64	4	4	2	4	1	1	1
	8	512	512	512	1024	512	512	512	128	256	32	32	2	256	128	64	256	32	64	256	16	16	8	4	4	2	2	2	1	1
	9	512		512	1024	512	512	2048	128	512	64	1	4	512	128	128	128	64	64	512	32	16	8	8	2	2	2	1	1	1
	10	512		512	512					512	128	2	4	512	64	64	256		32	32	32	16	32	4	4	2	2	1	1	1
título promedio de anticuerpo (GMT)		512,0	608,9	512,0	512,0	512,0	376,3	1755,6	474,0	388,0	97,0	6,5	4,9	388,0	222,9	78,8	222,9	59,3	68,6	315,2	52,0	29,9	21,1	2,8	2,6	2,1	2,1	1,3	1,0	1,0
varianza		0,0	237,0	188,9	588,9	0,0	169,3	1265,7	356,3	250,6	64,4	25,5	19,0	132,2	308,3	30,9	147,8	27,7	66,1	344,7	78,2	78,6	21,7	2,6	1,0	2,0	0,6	0,5	0,0	0,0
proporción de conversión positiva (título de anticuerpo no inferior al 32%)		100,0	100,0	100,0	100,0	90,0	90,0	100,0	100,0	100,0	100,0	30,0	10,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	70,0	50,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

[Tabla 13]

Vacuna contra la gripe del nuevo tipo A/Indo con adición de Ampligen y CVP; consideración de la frecuencia de administración de la dosis en ratón; Prueba ELISA de IgG en suero (07/07/2009)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
cantidad de antígeno administrado (µg de HA/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,3	0,3	0,3	ninguna (solución salina)
frecuencia de administración		4			3			2			1			4			3			2			1			4	3	2	1	1
vía de administración		trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	intra muscular	trans nasal
adición de adyuvante (Ampligen), CVP		sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
No. de animal	1	51200	102400	12800	51200	25600	25600	12800	12800	3200	800	3200	200	6400	6400	3200	6400	1600	800	1600	1600	1600	200	50	50	25600	51200	3200	1600	50
	2	102400	102400	25600	25600	51200	6400	12800	3200	6400	400	3200	100	6400	6400	1600	3200	3200	3200	3200	1600	100	200	100	50	12800	51200	6400	400	50
	3	102400	102400	12800	25600	51200	25600	1600	12800	1600	3200	400	200	400	3200	6400	3200	12800	3200	12800	3200	200	400	100	50	25600	51200	12800	200	50
	4	204800	12800	25600	51200	25600	3200	12800	12800	3200	1600	200	200	3200	25600	6400	12800	3200	1600	12800	400	100	200	100	50	12800	51200	12800	400	50
	5	12800	25600	12800	25600	51200	6400	6400	3200	1600	1600	200	400	6400	12800	1600	6400	1600	1600	12800	800	400	200	100	50	12800	204800	6400	400	50
	6	25600	51200	51200	51200	25600	6400	6400	12800	3200	1600	1600	400	6400	25600	1600	6400	800	12800	1600	400	200	200	100	50	25600	51200	12800	200	50
	7	25600	25600	12800	51200	51200	3200	25600	12800	6400	400	200	100	25600	3200	1600	6400	1600	1600	800	100	1600	200	50	50	25600	102400	12800	400	50
	8	102400	25600	25600	25600	25600	25600	12800	3200	12800	6400	6400	100	6400	3200	1600	12800	12800	3200	3200	200	100	100	100	50	12800	102400	12800	400	50
	9	102400		102400	51200	51200	25600	6400	3200	6400	200	200	400	25600	25600	1600	6400	3200	1600	3200	200	100	100	100	50	25600	102400	25600	200	50
	10	25600		51200	25600					6400	400	3200	1600	12800	1600	1600	12800		800	3200	200	100	200	100	50	102400	102400	12800	1600	50
título promedio de anticuerpo (GMT)		54874,8	33199,1	27437,4	38802,3	34836,2	7465,8	10972,7	5486,4	4525,5	800,0	800,0	263,9	7879,3	7879,3	2111,2	7879,3	2539,8	2425,1	3200,0	373,2	246,2	162,5	87,1	80,0	22286,1	77604,7	10396,8	428,7	50,0
varianza		59259,1	37474,6	27684,1	13219,8	13492,4	10666,7	5938,9	5252,7	3204,4	1853,4	2104,1	445,8	8506,6	10064,3	1554,9	3710,4	6322,2	4710,3	4431,0	577,4	607,5	483	21,1	0,0	26849,5	48572,6	6043,4.	545,3	0,0

[Tabla 14]

Vacuna contra la gripe del nuevo tipo A/Indo con adición de Ampligen y CVP; consideración de la frecuencia de administración de la dosis en ratón; Prueba de HI en suero (19/06/2009)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
cantidad de antígeno administrado (µg de HA/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,3	0,3	0,3	ninguna (solución salina)
frecuencia de administración		4			3			2			1			4			3			2			1			4	3	2	1	1
vía de administración		trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	transn asal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	trans nasal
adición de adyuvante (Ampligen), CVP		sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	ningu no	ninguno	ninguno	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ninguno	ninguno	ningu no	ningu no	ninguno	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ninguno
No. de animal	1	20	5	20	40	20	10	40	20	5	5	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	5	5	5	20	40	5	10	5
	2	5	160	40	20	20	10	5	10	5	5	10	5	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	5	5	20	20	5	5	5
	3	40	40	10	40	5	5	20	10	5	5	5	10	5	5	5	20	5	5	5	5	5	5	5	5	10	20	20	10	5
	4	80	10	10	20	10	5	10	40	5	5	5	10	5	5	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	10	40	10	5	5
	5	20	10	20	40	20	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	160	5	5	5
	6	20	40	5	80	20	5	10	20	5	10	5	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	40	5	5	5
	7	20	5	10	20	20	5	80	20	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	40	10	5	5
	8	40	20	20	5	20	5	40	10	80	20	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	160	10	5	5
	9	40		10	20	40	10	40	10	20	5	5	5	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	80	20	5	5
	10	20		40	10					5	5	10	5	5	5	5	20		5	5	5	5	5	5	5	10	40	20	10	5
título promedio de anticuerpo (GMT)		24,6	18,3	15,2	23,0	17,1	6,3	18,5	13,6	8,1	6,6	6,6	5,7	5,4	5,0	5,0	7,1	5,4	5,0	5,4	5,0	5,4	5,0	5,0	5,0	10,7	49,2	9,3	6,2	5,0
varianza		20,9	52,0	12,5	21,7	9,5	2,5	24,8	10,5	23,5	4,9	2,6	2,1	1,6	0,0	0,0	6,3	1,7	0,0	1,6	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	5,9	53,2	6,6	2,4	0,0
proporción de conversión positiva (título de anticuerpo no inferior al 32%)		40,0	37,5	20,0	40,0	11,1	0,0	44,4	11,1	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	0,0	0,0

[Tabla 15]

Prueba de HI en suero (23/07/2009) reactividad cruzada (A/VN)

grupo		4	5	7	8	26	27
cantidad de antígeno administrado (µg de HA/dosis)		0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3
frecuencia de administración		3		2		3	2
vía de administración		transnasal	transnasal	transnasal	transnasal	intramuscular	intramuscular
adición de adyuvante (Ampligen), CVP		sí	sí	sí	sí	ninguno	ninguno
No. de animal	1	5	20	5	5	5	5
	2	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	5	20	5
	4	5	5	5	5	10	5
	5	5	10	5	5	5	5
	6	5	5	5	5	5	5
	7	5	20	5	5	5	5
	8	5	20	5	5	5	5
	9	5	5	5	10	5	5
	10	5				5	5
título promedio de anticuerpo (GMT)		5,0	8,6	5,0	5,4	6,2	5,0
varianza		0,0	7,3	0,0	1,7	4,8	0,0
tasa de seroconversión (título de anticuerpos no inferior al 40%)		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

[Tabla 16]

Vacuna contra la gripe del nuevo tipo A/Indo con adición de Ampligen y CVP; consideración de la frecuencia de administración de la dosis en ratón; Prueba NT en suero (27/07/2009, 03/08/2009)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
cantidad de antígeno administrado (µg de HA/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,3	0,3	0,3	ninguna (solución salina)
frecuencia de administración		4			3			2			1			4			3			2			1			4	3	2	1	1
vía de administración		trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	trans nasal
adición de adyuvante (Ampligen), CVP		sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
No. de animal	1	1280	5120	640	2560	160	320	640	640	80	80	160	40	320	320	80	80	80	20	40	80	160	20	10	20	320	640	80	80	20
	2	80	5120	1280	640	640	320	640	160	320	80	320	40	1280	80	40	640	160	40	80	80	40	20	20	20	640	320	160	20	20
	3	2560	1280	320	2560	320	80	640	320	160	80	40	80	640	80	40	640	20	40	160	40	40	10	20	20	640	320	640	10	20
	4	2560	320	640	1280	320	80	640	640	80	80	40	80	1280	640	80	320	80	40	320	40	10	20	20	20	640	640	160	20	10
	5	320	320	320	2560	640	640	320	320	80	80	40	80	1280	160	20	160	40	40	320	40	40	20	20	20	160	640	160	20	5
	6	640	2560	640	5120	640	80	160	320	160	160	20	10	320	320	20	80	40	320	160	40	10	20	20	20	320	640	160	20	5
	7	1280	640	320	640	640	80	640	640	160	80	5	40	320	160	20	640	20	80	20	20	40	20	20	40	640	640	160	40	10
	8	1280	640	2560	160	640	640	320	320	640	320	320	5	80	80	20	160	320	20	160	20	10	20	20	10	320	2560	160	20	10
	9	2560		320	640	1280	320	640	320	160	40	40	5	640	640	10	160	160	40	320	40	20	10	10	10	2560	320	640	40	10
	10	640		2560	320					160	80	160	40	160	10	20	640		40	160	40	20	20	20	5	2560	640	1280	20	10
título promedio de anticuerpo (GMT)		905,1	1173,8	685,9	1039,7	508,0	201,6	470,3	373,3	160,0	91,9	60,6	28,3	452,5	149,3	28,3	259,9	68,6	46,7	130,0	40,0	26,4	17,4	17,4	162	597,1	597,1	242,5	24,6	10,7
varianza		947,5	2057,9	892,4	1553,2	320,0	230,2	192,3	180,9	169,7	80,1	121,0	30,0	480,7	229,6	25,5	256,3	97,7	94,9	113,2	20,7	44,6	4,2	4,2	9,4	902,7	658,4	383,2	20,2	5,9

[Tabla 17]

Vacuna contra la gripe del nuevo tipo A/Indo con adición de Ampligen y CVP; consideración de la frecuencia de administración de la dosis en ratón; Prueba NT en suero con la cepa A/Qinghai (06/11/2009, 09/11/2009)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
cantidad de antígeno administrado (µg de HA/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,3	0,3	0,3	ninguna (solución salina)
frecuencia de administración		4			3			2			1			4			3			2			1			4	3	2	1	1
vía de administración		trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	trans nasal
adición de adyuvante (Ampligen), CVP		sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	ninguno	ninguno	ningu no	ningu no	ningu no	ninguno	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ninguno	ningu no	ningu no	ningu no	ningu no	ninguno
No. de animal	1	160	40	5	80	20		5	40	40	20	20	160	80	160	20	40	10	10	10	40	40	10	20	10	80	80	40	80	20
	2	40	160	10	320	160	80	20	40	20	20	40	80	20	5	40	20	40	20	40	40	20	10	20	10	160	40	80	40	20
	3	320	20	10	320	20	40	80	40	20	20	20	80	20	20	40	80	10	5	20	20	10	10	20	20	320	40	80	40	10
	4	1280	10	20	40	10	10	5	160	40	20	160	40	40	320	20	40	80	20	40	20	20	20	20	20	160	640	40	5	5
	5	40	50	40	20	40	20	40	20	40	20	40	20	40	80	20	80	40	40	40	20	40	20	20	20	40	80	80	40	5
	6	20	320	10	160	40	40	80	80	40	40	40	10	40	160	40	20	20	5	40	20	20	20	20	20	80	80	160	40	5
	7	20	20	10	160	160	5	80	160	40	40	40	10	640	40	5	40	20	20	40	20	20	20	20	20	320	40	80	40	10
	8	640	10	20	80	20	80	80	80	40	40	160	5	80	80	20	80	80	20	20	10	5	20	20	40	160	160	40	5	20
	9	40		20	160	80	20	160	80	40	20	20	5	80	80	10	40	20	10	80	20	10	10	10	10	320	80	160	40	10
	10	80		80	160					40	20	80	20	40	40	40	160		20	80	20	10	20	20	5	40	640	160	20	10
título promedio de anticuerpo (GMT)		98,5	28,3	16,2	113,1	36,7	25,9	37,0	63,5	34,8	24,6	45,9	23,0	56,6	90,6	21,4	49,2	27,2	14,1	34,8	21,4	16,2	15,2	18,7	15,2	130,0	105,6	80,0	26,4	10,0
varianza		407,0	112,0	22,5	103,8	59,7	29,4	49,5	51,4	8,4	9,7	54,5	50,1	188,4	93,9	13,4	42,2	27,4	10,3	23,3	9,5	12,1	5,2	3,2	9,8	114,4	240,8	50,1	21,6	6,3

[Tabla 18]

Vacuna contra la gripe del nuevo tipo A/Anhui con adición de Ampligen y CVP; consideración de la frecuencia de administración de la dosis en ratón; Prueba NT en suero (27/07/2009, 03/08/2009)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
cantidad de antígeno administrado (µg de HA/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,3	0,3	0,3	ninguna (solución salina)
frecuencia de administración		4			3			2			1			4			3			2			1			4	3	2	1	1
vía de administración		trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	trans nasal
adición de adyuvante (Ampligen), CVP		sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
No. de animal	1	640	160	40	80	320	20	640	160	80	20	80	20	10	20	160	160	20	40	20	20	40	20	20	20	320	20	80	20	20
	2	80	320	40	320	320	80	80	40	20	40	80	20	80	20	10	40	160	40	20	10	20	20	20	20	320	40	80	20	20
	3	1280	80	320	320	80	640	80	80	80	40	20	20	20	80	40	80	20	40	40	20	80	20	20	20	320	160	40	20	20
	4	160	320	80	320	80	40	640	40	40	40	20	40	20	160	20	160	40	40	40	10	20	20	20	20	320	640	160	5	10
	5	640	80	20	640	320	40	80	80	40	20	20	20	80	20	40	80	40	40	80	20	20	20	20	20	80	160	80	20	5
	6	320	640	10	640	320	20	80	80	40	40	20	10	80	80	20	80	40	20	40	20	10	10	20	20	160	80	40	20	5
	7	160	320	80	320	80	40	160	640	20	20	5	20	40	40	10	40	40	40	20	20	10	20	20	20	160	1280	40	20	10
	8	160	10	640	80	320	80	640	160	640	80	20	5	40	10	10	160	160	40	40	10	10	20	20	20	320	160	40	5	20
	9	640		10	160	40	80	640	40	160	20	10	5	320	40	5	20	40	40	80	20	10	20	10	10	160	640	160	20	20
	10	20		640	80					160	20	40	20	160	10	20	80		40	40	20	20	20	20	5	640	640	20	20	20
título promedio de anticuerpo (GMT)		242,5	146,7	69,6	226,3	160,0	58,8	217,7	93,3	69,6	30,3	23,0	15,2	52,8	32,5	20,0	74,6	46,7	37,0	37,3	16,2	18,7	18,7	18,7	16,2	242,5	197,0	60,6	15,2	13,2
varianza		390,5	203,4	254,9	210,1	132,3	198,2	287,8	190,8	187,2	19,0	27,1	10,1	93,7	47,1	46,1	52,7	56,1	6,7	22,0	4,8	21,7	3,2	3,2	5,4	1546,6	407,3	49,9	6,3	6,7

[Tabla 19]

Vacuna contra la gripe del nuevo tipo A/Indo con adición de Ampligen y CVP; consideración de la frecuencia de administración de la dosis en ratón; Prueba NT en suero (24/08/2009, 27/08/2009) reacción cruzada (A/VN)

grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
cantidad de antígeno administrado (µg de HA/dosis)		0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,1	0,033	0,3	0,3	0,3	0,3	ninguna (solución salina)
frecuencia de administración		4			3			2			1			4			3			2			1			4	3	2	1	1
vía de administración		trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	tran snasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	trans nasal	intramus cular	intra mus cular	intra mus cular	intra mus cular	transnasal
adición de adyuvante (Ampligen), CVP		sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	ninguno	ningu no	ninguno	ningu no	ningu no	ninguno	ningu no	ningu no	ninguno	ningu no	ningu no	ninguno	ninguno	ningu no	ningun o	ningu no	ninguno
animal No.	1	40	20	10	40	160	40	5	40	40	80	80	40	10	40	10	40	40	40	20	40	40	40	20	40	80	20	80	80	40
	2	20	40	40	80	20	80	10	80	20	80	80	40	40	5	20	40	40	40	40	20	40	20	40	40	20	40	80	40	80
	3	40	40	10	40	40	160	20	80	20	80	40	20	40	20	20	40	20	40	20	40	20	40	40	40	80	40	80	40	40
	4	160	40	80	40	10	40	10	40	40	80	40	40	10	80	10	20	40	40	40	5	40	40	80	40	80	160	40	5	10
	5	80	20	20	40	80	40	40	10	40	80	40	40	10	20	20	80	40	40	40	40	40	20	20	40	20	80	40	40	5
	6	10	80	10	20	40	20	20	40	40	80	20	10	10	20	20	80	20	40	20	40	20	20	40	40	40	80	40	40	5
	7	20	10	10	40	40	80	40	40	40	80	10	40	10	20	5	40	40	40	20	40	20	40	20	40	40	40	40	40	20
	8	40	10	20	80	40	40	10	40	40	80	40	5	20	20	10	20	20	40	20	10	20	40	40	40	160	80	40	10	40
	9	40		20	40	80	20	80	40	40	80	40	5	20	20	5	20	40	40	40	40	20	20	20	20	20	80	40	80	20
	10	20		80	80					80	80	40	40	40	20	20	80		40	5	40	40	40	40	10	20	80	40	40	20
título promedio de anticuerpo (GMT)		34,8	25,9	21,4	45,9	43,2	46,7	18,5	40,0	37,3	80,0	37,3	21,4	17,4	21,4	12,3	40,0	31,7	40,0	23,0	26,4	28,3	30,3	32,5	32,5	42,9	60,6	40,0	32,5	20,0
varianza		44,2	23,1	27,9	21,6	45,3	44,1	24,0	21,9	16,3	0,0	22,1	16,0	13,7	20,6	6,6	25,0	10,0	0,0	12,5	14,2	10,5	10,3	18,4	10,8	45,0	39,2	19,3	24,3	22,9

(Ejemplo 3)

Administración de una vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo administración transnasal y prueba de la evaluación de la respuesta inmunitaria utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis)

Basándose en la relación entre la dosis de administración, la utilización y la respuesta inmunitaria obtenidas mediante los experimentos con ratones en el ejemplo 2, se realizaron pruebas de administración utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis) como animal próximo al ser humano, y se buscaron la forma de dosificación y la composición óptimas como vacuna del tipo de administración transnasal y se investigó la utilidad desde el punto de vista de la defensa contra la infección.

Para ser exactos, se realizaron (1) una búsqueda de la forma de dosificación/composición óptimas mediante la comparación de las respuestas inmunitarias después de la administración de las vacunas candidatas del tipo de administración transnasal, y (2) una evaluación de la practicidad de la capacidad de defensa contra la infección mediante la medición de títulos de anticuerpo en suero y membrana de mucosa después de la inoculación de la vacuna.

La búsqueda se realizó mediante una prueba inmunoquímica del suero (título de anticuerpos HI de la gripe, título de anticuerpos IgG en ELISA y título de anticuerpos neutralizantes) y una prueba inmunoquímica de un frotis nasal (título de anticuerpos IgA en ELISA específicos contra la gripe).

(Procedimiento de prueba)

1. Solución madre de la vacuna contra la gripe:

Solución madre de la vacuna contra la gripe (cepa H5N1) (No. de lote, FPBMQI0813, concentración de proteína: 816 µg/ml, contenido de HA 324 µg HA/ml, origen de la cepa del virus A/ánsar indio/Qinghai/1A/2005 (H5N1))

2. Origen de la cepa del virus y antígeno de vacuna inactivado que se utilizará para la prueba

(para la medición del título de anticuerpos específicos)
cepa A/ánsar indio/Qinghai/1A/2005 (H5N1): cepa atenuada (clado 2.2) de A/Qinghai/1A/2005 (H5N1)

(para la medición de títulos de anticuerpos de reactividad cruzada)
cepa A/Indo/5/2005 (H5N1)/PR8-IBCDC-RG2: cepa atenuada (clado 2.1) de A/Indonesia/5/2005 (H5N1)
cepa A/Anhui/01/2005 (H5N1)/PR8-IBCDC-RG5: cepa atenuada (clado 2.3) de A/Anhui/01/2005 (H5N1)
cepa NIBRG-14: cepa atenuada (clado 1) de A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)

3. Adyuvante y aditivo que se utilizarán para la prueba

Ampligen: fabricado por Hemispherx, (que contiene 10,61 mg/ml de Ampligen)
polímero de carboxivinilo (CVP): fabricado por Toko Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisya, lote INF-619 (que contiene CVP al 1,1%, L-arginina al 2,4% y glicerol al 2%)
poli L-arginina: fabricada por SIGMA, No. de catálogo P-3892, lote 107K5103 (PM > 70.000)

4. Procedimiento de prueba

La figura 4 muestra un diagrama de flujo de la prueba.

[Tabla 20]

Constitución del grupo de prueba:

grupo	antígeno HA de vacuna (µg/dosis)	Ampligen (µg/dosis)	Poli L-Arg (µg/dosis)	adición de CVP	cabeza	nota
1	30			-	4	vacuna sola
2	30	600		O	4	vacuna experimental
3	30		1.500	O	4	Poli L-Arg
4	-			-	1	grupo de control

Se administraron por vía transnasal monos Cynomolgus (Macaca fascicularis) anestesiados con una vacuna que contenía el antígeno del virus de cepa A/Ánsar indio/Qinghai/1A/2005 (H5N1) o solución salina en intervalos de 3 semanas, utilizando un dispositivo de administración transnasal con activador de prueba (activador de prueba: fabricado por Toko Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisya, bomba de pulverizador, Apta Pharma, tipo VP-7, utilización para pulverización) seis veces mediante 150 µl (50 µl x 3) en cada cavidad nasal (un total de 300 µl), y se tomaron muestras (frotis nasal y suero) en el momento de cada administración, y cada 2 semanas a partir de la dosis de refuerzo hasta 12 semanas desde la dosis de refuerzo. Además, en caso necesario, a partir de entonces, se tomaron muestras de sangre y frotis nasales cada dos semanas.

Animal y vacuna:

animal: monos Cynomolgus (Macaca fascicularis) (17 monos Cynomolgus macho, 46 - 58 meses de vida cuando se inició la prueba, peso corporal de 2,8 - 3,5 kg en noviembre de 2009), grupo 1 - grupo 4: 4 monos cynomolgus/grupo, grupo 5 (control negativo): mono cynomolgus/grupo

vacuna experimental para la prueba y dosis de adyuvante:

(1) grupo de la vacuna sin adición: [30 µg de HA]/dosis
(2) grupo de la vacuna con adición de Ampligen + CVP: [30 µg de HA + 600 µg de Ampligen + CVP al 0,55%]/dosis
(3) grupo de la vacuna con adición de poli L-arginina + CVP: [30 µg de HA + poli L-arginina al 0,5% + CVP al 0,55%]/dosis
(4) Grupo de control negativo: solución salina

volumen de administración de la vacuna: 150 µl para cada cavidad nasal, un total de 300 µl

5. Elementos de medición de cada muestra

frotis nasal: título de anticuerpos específicos de IgA en ELISA y concentración de IgA

Con el frotis nasal se midió la concentración total de IgA y el título de anticuerpos específicos de IgA en ELISA calculado de la misma manera que en el ejemplo 2 se modificó para que el valor numérico por concentración total de IgA fuera de 1 µg/ml.

suero: título de anticuerpos específicos de IgG en ELISA, título de anticuerpos específicos de HI (inhibición de la hemaglutinación) de reactividad cruzada, título de anticuerpos neutralizantes específicos/de reactividad cruzada

Entre los elementos de medición mencionados anteriormente, la descripción del procedimiento de medición de los títulos de anticuerpos en ELISA fue tal como se describe a continuación.

El antígeno de la vacuna (diluido con tampón carbonato 100 mM (pH 9,6) hasta una concentración de proteína de 1 µg/ml) se dispuso en fase sólida (4ºC, durante la noche) sobre una placa de 96 pocillos para ELISA a razón de 100 µl/pocillo, y se lavó 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Se añadió una muestra diluida 2 veces en serie o un control negativo a 100 µl/pocillo. A continuación, la placa se incubó a 37ºC durante 1 hora y se lavó 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Se añadió un anticuerpo para la detección (IgG contra mono marcada con fosfatasa alcalina o IgA contra mono marcada con biotina) a 100 µl/pocillo. La placa se incubó a 37ºC durante 1 hora y se lavó 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Se añadió la solución de sustrato (4-NPP o TMB) a 100 µl/pocillo y la mezcla se protegió de la luz solar y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió una solución de desactivación (H_2SO_4 2M para 4-NPP o solución de desactivación de 650 nm para TMB) y se midió la absorbancia a (405 nm o 655 nm).

La tasa de dilución máxima que permite una absorbancia de la muestra superior a la absorbancia promedio del control negativo + 2SD se tomó como el título de anticuerpos de la muestra. Para el título de anticuerpos específicos, se utilizó la misma cepa que el antígeno de la vacuna de administración, para el título de anticuerpos de reactividad cruzada, se utilizó un antígeno de vacuna de una cepa diferente. A continuación, se midieron de la misma manera el título de anticuerpos de HI y el título de anticuerpos neutralizantes.

título de anticuerpos específicos de HI (inhibición de la hemaglutinación) y título de anticuerpos de HI de reactividad cruzada: se midieron de la misma manera que en el ejemplo 2.

título de anticuerpos específicos neutralizantes y título de anticuerpos neutralizantes de reactividad cruzada: se midieron de la misma manera que en el ejemplo 2.

(Resultados)

Los resultados se muestran en las tablas 21-30 y las figuras 5-7.

Se confirmó que la administración por pulverización transnasal de una vacuna que contiene Ampligen y CVP a monos induce la producción específica de IgA en la membrana de mucosa y la derivación de anticuerpos específicos neutralizantes en el suero. Dado que estos efectos eran insuficientes con una vacuna sin aditivos, se confirmó la utilidad de la adición de Ampligen y CVP.

[Tabla 21]

Administración de la vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo de administración transnasal y prueba de evaluación de la respuesta inmunitaria utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis);

Composición de vacuna

grupo	antígeno HA de vacuna (ml) [324 μg de HA/ml]	Ampligen (ml) [10,61 mg/ml]	Poli L-Arg (ml) [100 mg/ml]	Adición de CVP (ml)	M/75 PBS (pH 7,2) (ml)	Nota	dosis (μl)
1	3,087 (30 μg/dosis)	-	-	-	6,913	10 ml min	300
2	3,087 (30 μg/dosis)	1,885 (600 μg/dosis)	-	5,0 (sí)	0,028	10 ml min	300
3	-	-	0,750 (1,5 mg/dosis)	-	4,250	5 ml min	100
	3,704 (30 μg/dosis)	-	-	4	0,296	8 ml min	200
4		-	-	-	10,000	10 ml min	300

Solución madre de la vacuna contra la gripe que se utiliza para la prueba
solución madre de la vacuna contra la gripe (cepa H5N1): No. de lote FPBMQI0813
(concentración de proteína: 816 μg/ml, contenido de HA 324 μg de HA/ml)
origen de la cepa del virus: A/ánsar indio/Qinghai/1A/2005 (H5N1)
adyuvante y aditivo que se utilizan para la prueba
Ampligen (fabricado por Hemispherx): que contiene 10,61 mg/ml de Ampligen
polímero de carboxivinilo (fabricado por Toko Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisya): lote INF-619 (que contiene CVP (polímero de carboxivinilo) al 1,1%, L-arginina al 2,4% y glicerol al 2%)
poli L-arginina (fabricada por SIGMA, No. de catálogo P-3892): lote, utilizado después de disolver 107K5103 (PM > 70.000) en 100 mg/ml

[Tabla 22]

Administración de la vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo de administración transnasal y prueba de evaluación de la respuesta inmunitaria (HI) utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis); antes de la administración (se recogieron muestras de sangre el 28/01/2010/se midieron el 02/02/2010)

grupo		1	2	3	4
antígeno HA de vacuna (μg/dosis)		30	30	30	-
Ampligen (μg/dosis)			600		
Poli L-Arg (μg/dosis)				1.500	
adición de CVP		-	+	+	-
No. de animal	1	5	5	5	5
	2	5	5	5	
	3	5	5	5	
	4	5	5	5	
título promedio de anticuerpo (GMT)		5,0	5,0	5,0	5,0
varianza		0,0	0,0	0,0	
tasa de seroconversión (título de anticuerpos no inferior al 40%)		0,0	0,0	0,0	0,0

[Tabla 23]

Administración de la vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo de administración transnasal y prueba de evaluación de la respuesta inmunitaria (HI) utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis); después de la administración una vez (se recogieron muestras de sangre el 18/02/2010/se midieron el 23/02/2010)

grupo		1	2	3	4
antígeno HA de vacuna (μg/dosis)		30	30	30	-
Ampligen (μg/dosis)			600		
Poli L-Arg (μg/dosis)				1.500	
adición de CVP		-	+	+	-
No. de animal	1	20	5	5	5
	2	10	5	5	
	3	5	5	5	
	4	5	10	5	
título promedio de anticuerpo (GMT)		8,4	5,9	5,0	5,0
varianza		7,1	2,5	0,0	
tasa de seroconversión (título de anticuerpos no inferior al 40%)		0,0	0,0	0,0	0,0

[Tabla 24]

Administración de la vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo de administración transnasal y prueba de evaluación de la respuesta inmunitaria (HI) utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis); después de la administración dos veces (se recogieron muestras de sangre el 04/03/2010/se midieron el 09/03/2010)

grupo		1	2	3	4
antígeno HA de vacuna (μg/dosis)		30	30	30	-
Ampligen (μg/dosis)			600		
Poli L-Arg (μg/dosis)				1.500	
adición de CVP		-	+	+	-
No. de animal	1	5	5	5	5
	2	5	5	5	
	3	5	5	5	
	4	5	5	5	
título promedio de anticuerpo (GMT)		5,0	5,0	5,0	5,0
varianza		0,0	0,0	0,0	
tasa de seroconversión (título de anticuerpos no inferior al 40%)		0,0	0,0	0,0	0,0

[Tabla 25]

Administración de la vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo de administración transnasal y prueba de evaluación de la respuesta inmunitaria (HI) utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis); dos semanas después de la administración dos veces (se recogieron muestras de sangre el 18/03/2010/se midieron el 24/03/2010)

grupo		1	2	3	4
antígeno HA de vacuna (μg/dosis)		30	30	30	-
Ampligen (μg/dosis)			600		
Poli L-Arg (μg/dosis)				1.500	
adición de CVP		-	+	+	-
No. de animal	1	5	5	5	5
	2	5	5	5	
	3	5	5	5	
	4	5	5	5	
título promedio de anticuerpo (GMT)		5,0	7,1	5,9	5,0
varianza		0,0	2,9	2,5	
tasa de seroconversión (título de anticuerpos no inferior al 40%)		0,0	0,0	0,0	0,0

[Tabla 26]

Administración de la vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo de administración transnasal y prueba de evaluación de la respuesta inmunitaria (NT) utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis); antes de la administración (se recogieron muestras de sangre el 28/01/2010/se midieron el 02/02/2010)

grupo		1	2	3	4
antígeno HA de vacuna (μg/dosis)		30	30	30	-
Ampligen (μg/dosis)			600		
Poli L-Arg (μg/dosis)				1.500	
adición de CVP		-	+	+	-
No. de animal	1	5	10	5	5
	2	5	10	20	
	3	5	5	10	
	4	5	5	20	
título promedio de anticuerpo (GMT)		5,0	7,1	11,9	5,0
varianza		0,0	2,9	7,5	

[Tabla 27]

Administración de la vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo de administración transnasal y prueba de evaluación de la respuesta inmunitaria (NT) utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis) después de la administración una vez en NT (se recogieron muestras de sangre el 18/02/2010/se midieron el 23/02/2010)

grupo		1	2	3	4
antígeno HA de vacuna (μg/dosis)		30	30	30	-
Ampligen (μg/dosis)			600		
Poli L-Arg (μg/dosis)				1.500	
adición de CVP		-	+	+	-
No. de animal	1	5	10	20	5
	2	10	20	5	
	3	20	20	10	
	4	5	160	140	
título promedio de anticuerpo (GMT)		8,4	28,3	19,3	5,0
varianza		7,1	71,8	64,5	

[Tabla 28]

Administración de la vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo de administración transnasal y prueba de evaluación de la respuesta inmunitaria (NT) utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis); después de la administración dos veces en NT (se recogieron muestras de sangre el 04/03/2010/se midieron el 09/03/2010)

grupo		1	2	3	4
antígeno HA de vacuna (µg/dosis)		30	30	30	-
Ampligen (µg/dosis)			600		
Poli L-Arg (µg/dosis)				1.500	
adición de CVP		-	+	+	-
No. de animal	1	20	20	80	5
	2	40	160	5	
	3	40	160	80	
	4	10	1.280	40	
título promedio de anticuerpo (GMT)		23,8	160,0	33,6	5,0
varianza		15,0	587,1	36,1	

[Tabla 29]

Título de IgG en ELISA en suero después de la administración de una vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo administración transnasal (tipo H5N1) utilizando Macaca fascicularis

grupo		1	2	3	4
título de anticuerpos	previo	141,4	168,2	200,0	100,0
	después de 3 semanas	336,4	1.131,2	237,8	50,0
	después de 5 semanas	951,4	4.525,5	1.600,0	200,0
	después de 7 semanas	400,0	5.381,7	800,0	100,0

[Tabla 30]

Título de IgA en ELISA en un frotis nasal después de la administración de una vacuna contra la gripe (tipo H5N1) del tipo administración transnasal (tipo H5N1) utilizando monos Cynomolgus (Macaca fascicularis)

grupo		1	2	3	4
título de anticuerpos	previo	0,7	1,5	1,4	1,1
	después de 3 semanas	0,9	1,6	1,3	0,5
	después de 5 semanas	0,7	4,4	2,9	0,6
	después de 7 semanas	2,9	4,3	6,5	0,6

REIVINDICACIONES

1. Composición de vacuna para administración a través de la mucosa nasal, que comprende (i) un antígeno del virus de la gripe, (ii) ácido polirriboinosínico polirribocitidílico (poli (I:C)), poli ($I:C_xU$) o poli ($I_xU:C$), y (iii) un polímero de carboxivinilo, en la que x es, de promedio, un número de 3 a 40.

2. Composición, según la reivindicación 1, en la que el antígeno es un antígeno subunidad o un antígeno inactivado.

3. Composición, según la reivindicación 2, en la que el antígeno subunidad comprende, como mínimo, un antígeno subunidad seleccionado del grupo que comprende HA, NA, M1, M2, NP, PB1, PB2, PA y NS2 del virus de la gripe.

4. Composición, según la reivindicación 2, en la que el antígeno subunidad comprende, como mínimo, un antígeno subunidad seleccionado del grupo que comprende HA y NA.

5. Composición, según la reivindicación 1, en la que el poli ($I:C_xU$) es poli ($I:C_{12}U$).

6. Composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de (i) un antígeno del virus de la gripe, (ii) poli (I:C), poli ($I:C_xU$) o poli ($I_xU:C$), y (iii) un polímero de carboxivinilo, en la que x es en promedio un número de 3 a 40, siendo dicha composición para la utilización en un procedimiento de prevención de la gripe, que comprende una etapa de administrar dicha composición, como mínimo, una vez a la mucosa nasal de un paciente con necesidad de la misma.

7. Composición para la utilización, según la reivindicación 6, en la que el antígeno es un antígeno subunidad o un antígeno inactivado.

8. Composición para la utilización, según la reivindicación 7, en la que el antígeno subunidad comprende, como mínimo, un antígeno subunidad seleccionado del grupo que comprende HA, NA, M1, M2, NP, PB1, PB2, PA y NS2 del virus de la gripe.

9. Composición para la utilización, según la reivindicación 7, en la que el antígeno subunidad comprende, como mínimo, un antígeno subunidad seleccionado del grupo que comprende HA y NA.

10. Composición para la utilización, según la reivindicación 6, en la que el poli ($I:C_xU$) es poli ($I:C_{12}U$).

11. Composición para la utilización, según la reivindicación 6, en la que el procedimiento comprende administrar la composición, como mínimo, dos veces.

12. Composición para la utilización, según la reivindicación 11, en la que el procedimiento comprende administrar la composición en un intervalo, como mínimo, de una semana.

Fig. 1

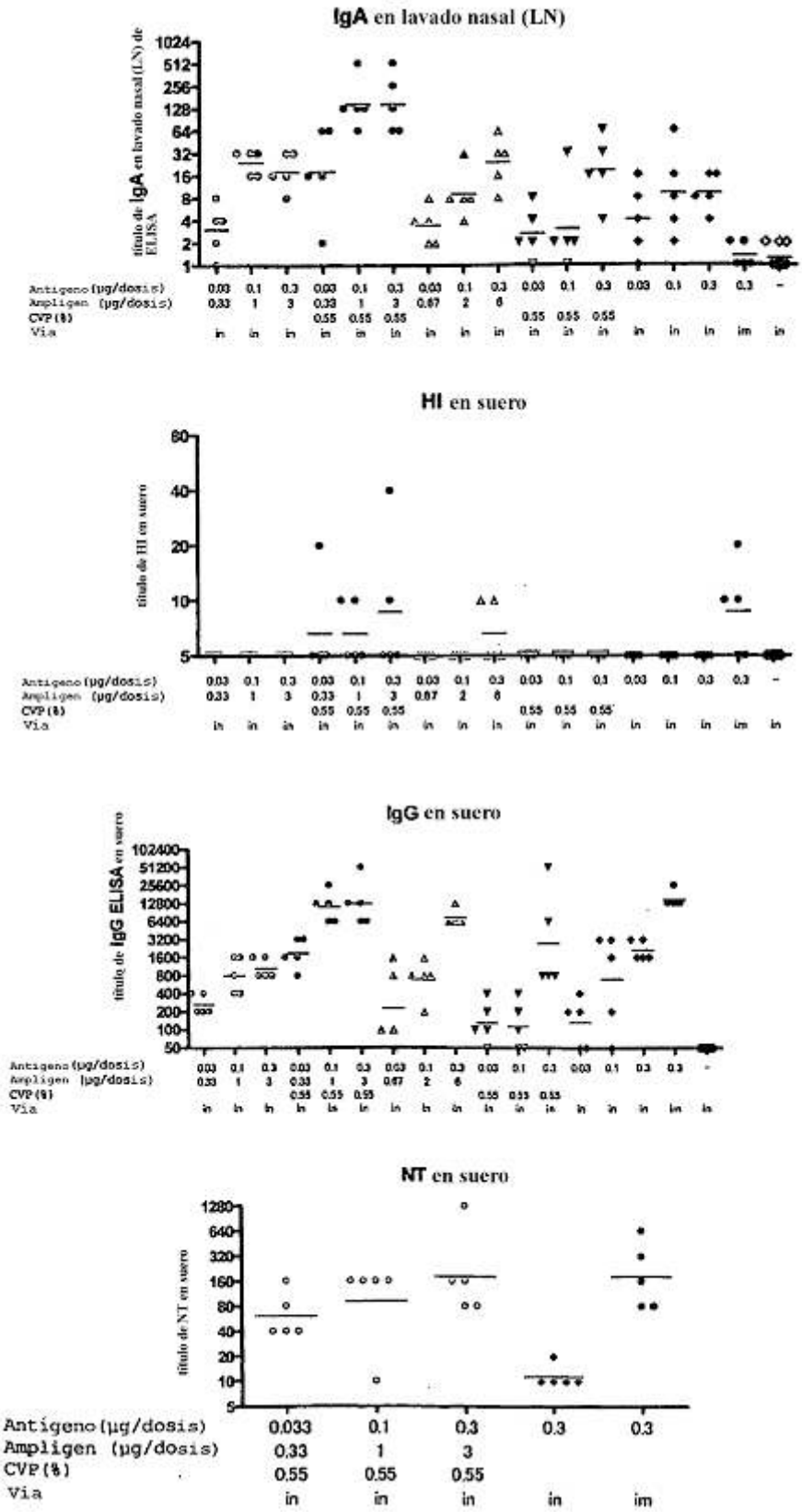

IgA en lavado nasal (LN)
título de IgA en lavado nasal (LN) de ELISA
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
1
Antígeno (µg/dosis) 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.3 -
Ampligen (µg/dosis) 0.33 1 3 0.33 1 3 0.67 2 6
CVP (%) 0.55 0.55 0.55 0.55 0.55 0.55
Vía in in in in in in in in in in in in in in in im in
HI en suero
título de HI en suero
80
40
20
10
5
Antígeno (µg/dosis) 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.3 -
Ampligen (µg/dosis) 0.33 1 3 0.33 1 3 0.67 2 6
CVP (%) 0.55 0.55 0.55 0.55 0.55 0.55
Vía in in in in in in in in in in in in in in in im in
IgG en suero
título de IgG ELISA en suero
102400
51200
25600
12800
6400
3200
1600
800
400
200
100
50
Antígeno (µg/dosis) 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.03 0.1 0.3 0.3 -
Ampligen (µg/dosis) 0.33 1 3 0.33 1 3 0.67 2 6
CVP (%) 0.55 0.55 0.55 0.55 0.55 0.55
Vía in in in in in in in in in in in in in in in im in
NT en suero
título de NT en suero
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
Antígeno (µg/dosis) 0.033 0.1 0.3 0.3 0.3
Ampligen (µg/dosis) 0.33 1 3
CVP (%) 0.55 0.55 0.55
Vía in in in in im

Fig. 2

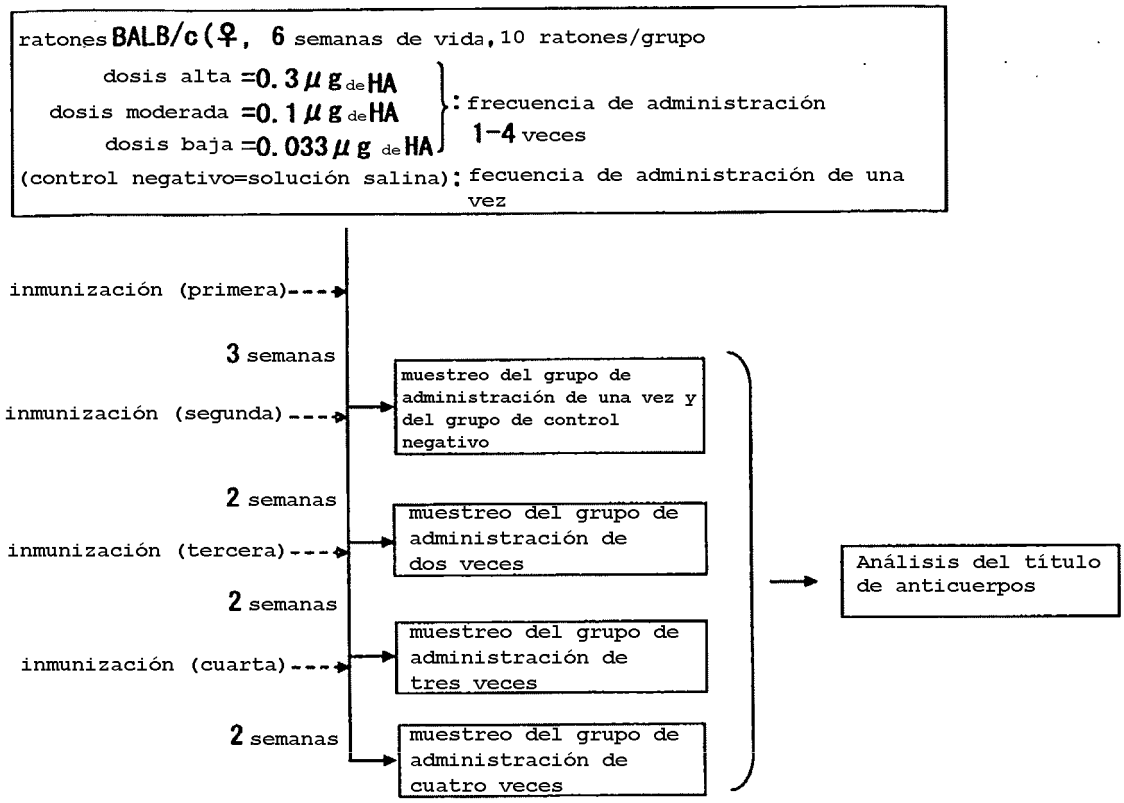
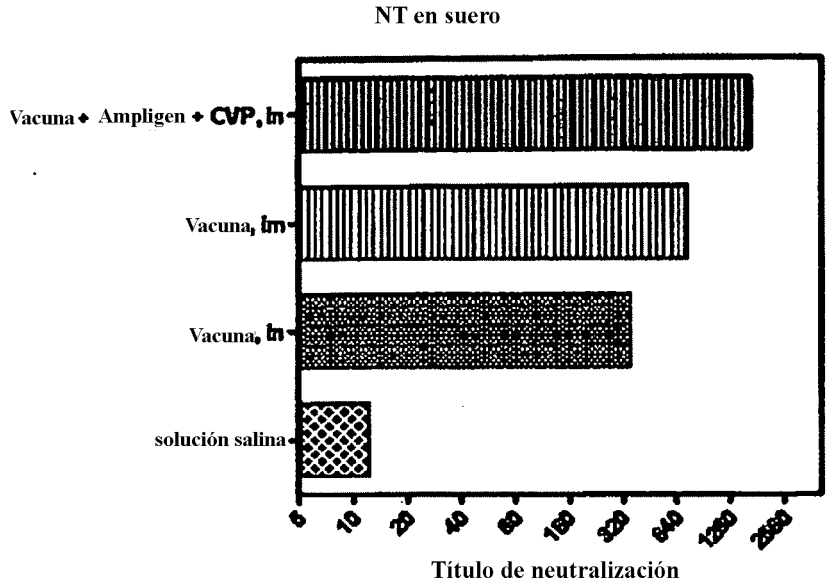

ratones BALB/c (♀, 6 semanas de vida, 10 ratones/grupo
dosis alta =0.3 μg de HA
dosis moderada =0.1 μg de HA
dosis baja =0.033 μg de HA
: frecuencia de administración 1-4 veces
(control negativo=solución salina): fecuencia de administración de una vez
inmunización (primera)
3 semanas
inmunización (segunda)
2 semanas
inmunización (tercera)
2 semanas
inmunización (cuarta)
2 semanas
muestreo del grupo de administración de una vez y del grupo de control negativo
muestreo del grupo de administración de dos veces
muestreo del grupo de administración de tres veces
muestreo del grupo de administración de cuatro veces
Análisis del título de anticuerpos

Fig. 3

Experimento de vacunación (ratón)



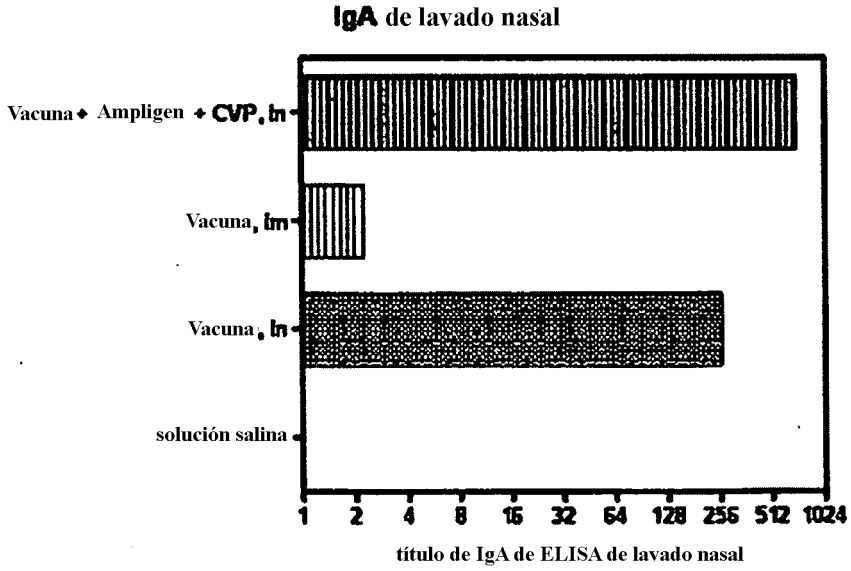


Fig. 4

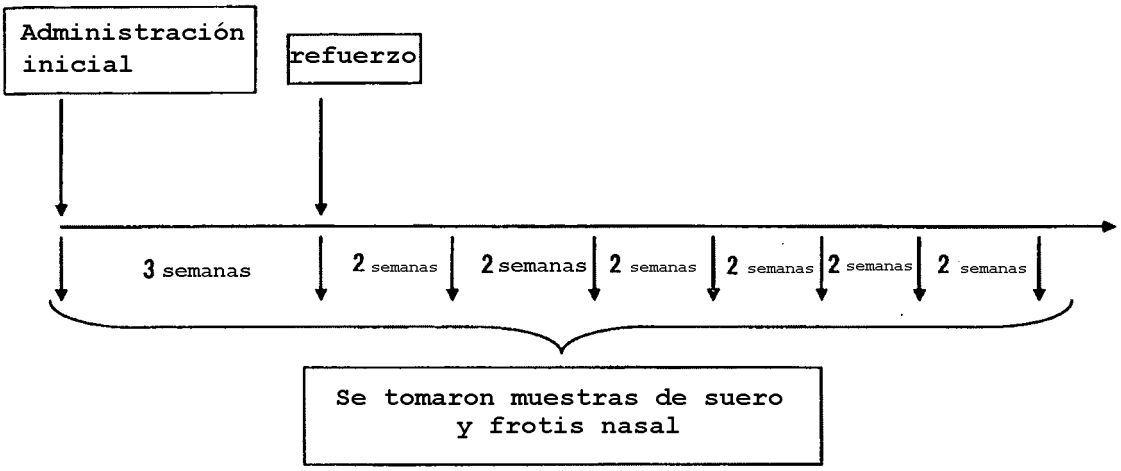

Administración inicial
refuerzo
3 semanas
2 semanas
2 semanas
2 semanas
2 semanas
2 semanas
2 semanas
Se tomaron muestras de suero y frotis nasal

Fig. 5

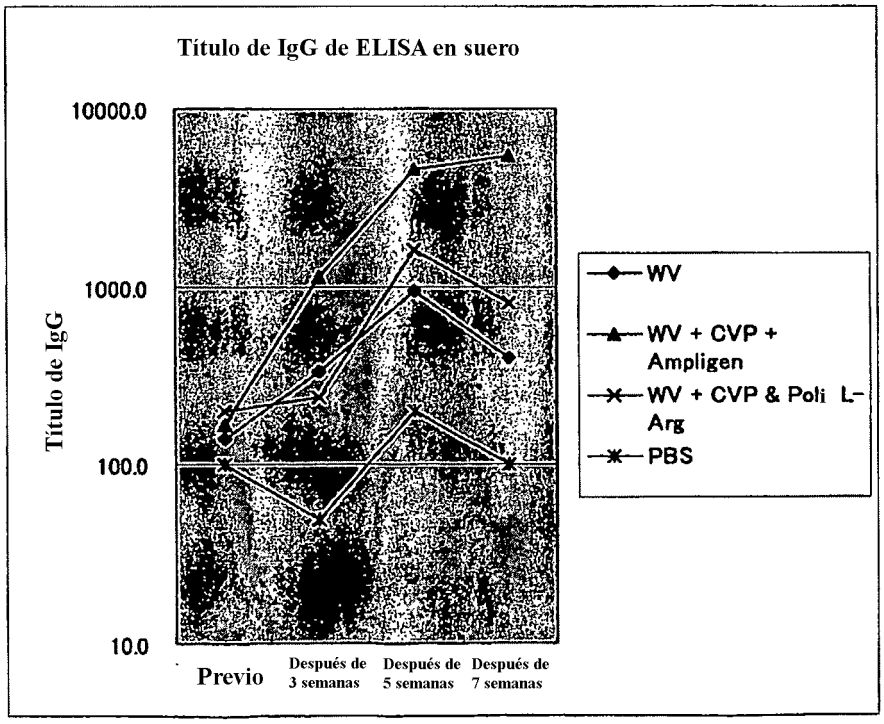

Título de IgG de ELISA en suero
10000.0
1000.0
100.0
10.0
Título de IgG
Previo
Después de 3 semanas
Después de 5 semanas
Después de 7 semanas
WV
WV + CVP + Ampligen
WV + CVP & Poli L-Arg
PBS

Fig. 6

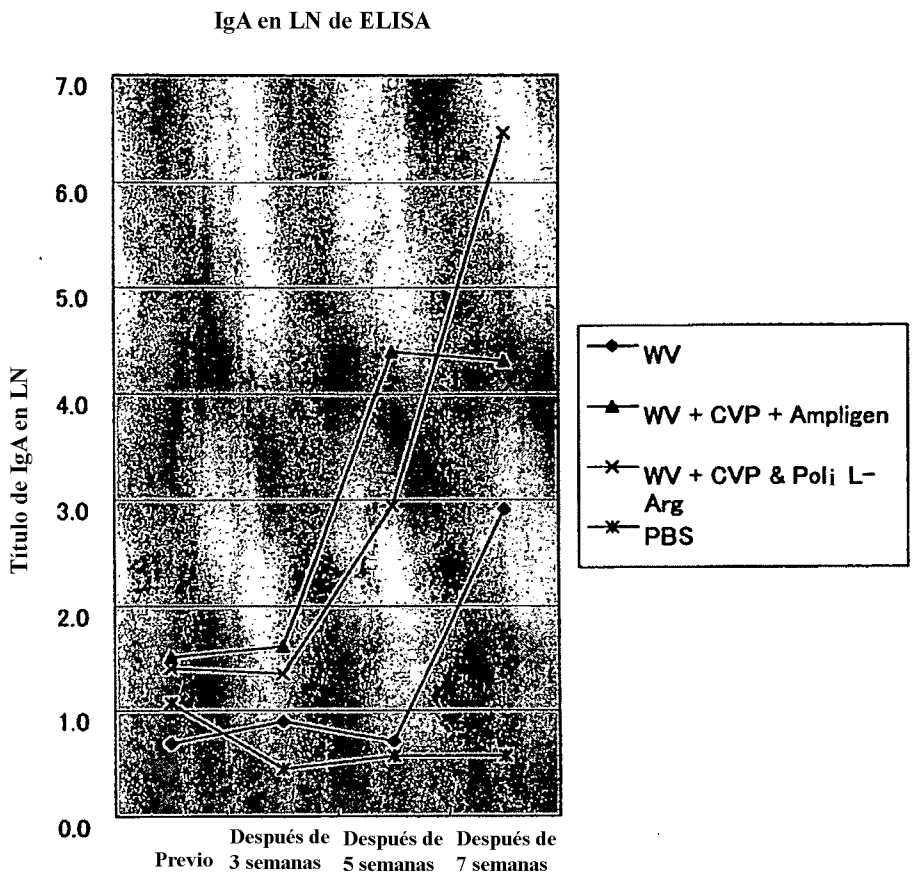
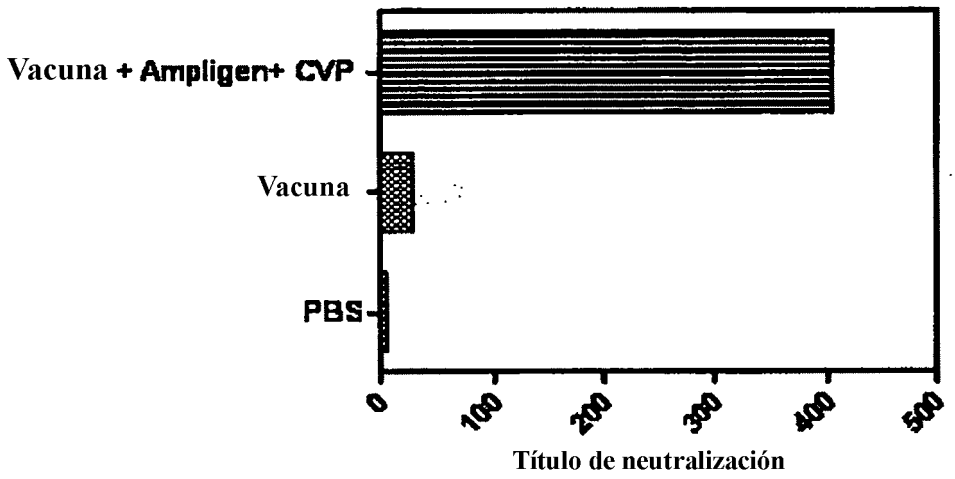
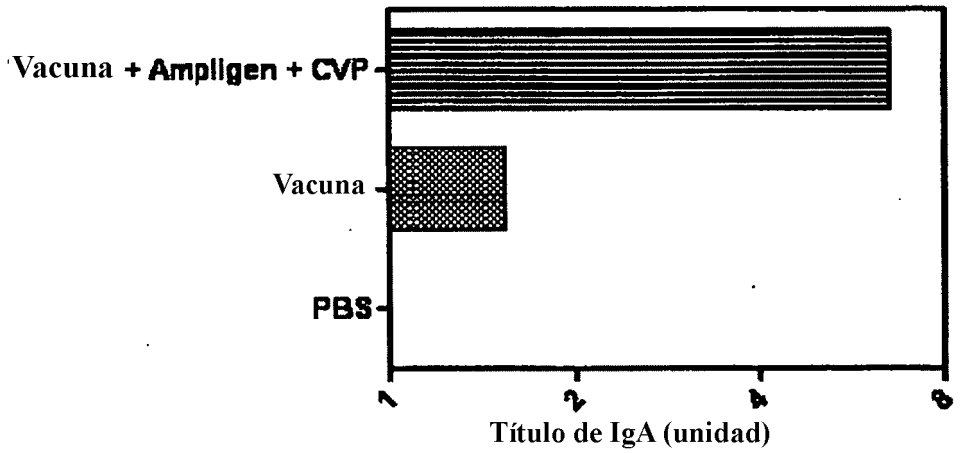

IgA en LN de ELISA
Título de IgA en LN
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
Previo
Después de 3 semanas
Después de 5 semanas
Después de 7 semanas
WV
WV + CVP + Ampligen
WV + CVP & Poli L-Arg
PBS

Fig. 7

Experimento de vacunación (mono)

NT en suero



IgA de frotis nasal