

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 722**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 39/39</b>	(2006.01) <b>A61K 47/61</b>	(2007.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01) <b>A61K 9/51</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/002</b>	(2006.01) <b>A61P 31/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/02</b>	(2006.01) <b>A61P 31/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/08</b>	(2006.01) <b>A61P 31/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/12</b>	(2006.01) <b>A61P 31/18</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/10</b>	(2006.01) <b>A61P 33/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/06</b>	(2006.01) <b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/28</b>	(2006.01)	
<b>A61K 47/36</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2009 PCT/JP2009/068647**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10050578**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2009 E 09823688 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2345419**

54 Título: **Vacuna mucosa que emplea nanogel catiónico**

30 Prioridad:

**31.10.2008 JP 2008281065**

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

**17.07.2017**

73 Titular/es:

**INTELLECTUAL PROPERTY STRATEGY  
NETWORK, INC. (100.0%)  
7-12, Marunouchi 1-chome  
Chiyoda-kuTokyo 100-0005, JP**

72 Inventor/es:

**AKIYOSHI KAZUNARI;  
KIYONO HIROSHI;  
YUKI YOSHIKAZU y  
NOCHI TOMONORI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 624 722 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Vacuna mucosa que emplea nanogel catiónico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una vacuna mucosa que comprende un compuesto de un antígeno de vacuna y un nanogel catiónico que se administra por vía transnasal.

10 **Técnica anterior**

Las vacunas mucosas no inyectables son seguras y fáciles de usar, y por esta razón han llamado la atención como las vacunas de la próxima generación. Era necesario administrar simultáneamente una vacuna mucosa con un adyuvante mucoso para inducir las respuestas inmunitarias específicas del antígeno eficaces con el uso de una vacuna mucosa. Como adyuvantes mucosos, se conocen las proteínas relacionadas con toxinas, tales como las toxinas del cólera (TC) o las toxinas del cólera destoxicadas (TCm). La adición de tales adyuvantes mucosos a las vacunas mucosas posibilita que las vacunas transnasales induzcan la IgA mucosa, además de la IgG sistémica específica del antígeno. Sin embargo, tal adyuvante mucoso puede migrar desventajosamente al cerebro, y la seguridad del mismo en los organismos sigue siendo problemática.

Los presentes inventores desarrollaron nanogeles que comprendían moléculas tales como el pululano portador de colesterol (CHP), que está compuesto de polisacáridos hidrófilos y de colesterol hidrófobo añadidos al mismo como cadena lateral, como sustratos de DDS (diaminocifenil sulfona) (véase el documento WO 00/12564, publicación de patente japonesa (*kokai*) N.º 2005-298644 A, el documento WO 2006/049032, publicación de patente japonesa (*kokai*) N.º 2006-143808 A, el documento WO 2007/083643, publicación de patente japonesa (*kokai*) N.º 2007-252304 A, y Hasegawa *et al.*, Saibou Kougaku (Cell Technology), Vol. 26, N.º 6, 2007, págs. 679-685). Específicamente, el CHP es capaz de autoensamblarse en un medio acuoso, y se convierte en coloides (nanogeles) con diámetros de 20 a 30 nm capaces de contener varias sustancias en su interior. Una característica excelente del CHP es los "efectos de acompañante molecular". Es decir, al contener una molécula, tal como una molécula de proteína, dentro de los nanogeles de CHP, seguido de la liberación de la misma, se produce el repliegamiento en el momento de la liberación, se forma una estructura fisiológica en 3D, y se ejerce la actividad normal.

Aunque se ha informado del uso de tales nanogeles para preparados de vacunas (véase la patente japonesa N.º 4033497), tales nanogeles se vuelven útiles al activar los linfocitos T citotóxicos (CTL) para aplicaciones de tratamientos contra el cáncer, antivíricos o contra enfermedades autoinmunitarias. Es decir, no podría decirse que los nanogeles siempre puedan surtir los efectos de las vacunas mucosas.

Además, se ha informado del uso de un liposoma que tiene una membrana lipídica que comprende glucolípidos y fosfolípidos para el suministro de vacunas orales (véase la publicación de patente japonesa (*kokai*) N.º H05-339169 A (1993)).

El documento US6,656,481 B1 describe un preparado de vacuna que comprende un antígeno y un polisacárido hidrofobizado que actúa como adyuvante. Bacon *et al.* (Infection and Immunity, vol. 68, n.º 10, pág. 5764-5770) describe la capacidad del quitosán para aumentar la inmunogenicidad de las vacunas contra la gripe suministradas a las vías respiratorias de los ratones. Illum *et al.* (Advanced Drug Delivery Reviews 51 (2001) 81-96) describe el quitosán como un sistema de suministro nasal para las vacunas. Satoh *et al.* (Eur. J. Cancer Suppl. 6(9) 139 (2008)) describe las nanopartículas del pululano portador de colesterol y un transportador de fármacos anticancerígenos. Soane *et al.* (International Journal of Pharmaceutics 178 (1999) 55-65) evalúa las características de eliminación de los sistemas de suministro nasal bioadhesivo que incluyen microesferas de quitosán y soluciones de quitosán.

Toita *et al.* (Journal of Nanoscience and Nanotechnology Vol. 8, 2279-2285, 2008) describe el suministro de puntos cuánticos empleando un nanogel catiónico.

55 **Divulgación de la invención**

Objetivo a lograr por la invención

La presente invención proporciona una vacuna mucosa para su administración transnasal, que es capaz de inducir respuestas inmunitarias específicas del antígeno de vacuna en organismos sin la adición de un adyuvante mucoso, tal como una proteína relacionada con una toxina (por ejemplo, la toxina del cólera (TC) o una toxina del cólera destoxicada (TCm)).

Medios para lograr el objetivo

Los presentes inventores anteriormente desarrollaron un nanogel que comprendía un polisacárido hidrófilo con colesterol hidrófobo añadido al polisacárido hidrófilo como cadena lateral, que puede emplearse para el suministro

de una sustancia, tal como una proteína fisiológicamente activa.

Los presentes inventores realizaron estudios concentrados para examinar la aplicabilidad de tal nanogel a la producción de vacunas mucosas. Como resultado, se descubrió que la administración de un compuesto de nanogeles que comprende grupos funcionales catiónicos, tales como grupos amino y antígenos de vacuna (es decir, proteínas víricas o bacterianas), a través de la membrana mucosa de la cavidad nasal, induciría respuestas inmunitarias sistémicas y respuestas inmunitarias mucosas más eficazmente de lo que sería posible con el empleo de un liposoma, y tal administración sería útil para la prevención o el tratamiento de infecciones víricas o bacterianas. Esto ha llevado a completar la presente invención.

Específicamente, la presente invención es como se indica a continuación.

[1] Un preparado de vacuna mucosa para su uso en un método de prevención o tratamiento de una infección microbiana, que comprende un compuesto de un nanogel y un antígeno de vacuna, en el que el nanogel es pululano portador de colesterol que tiene un grupo funcional catiónico, en el que el grupo funcional catiónico es un grupo amino y en el que el nanogel comprende de 5 a 30 de dichos grupos amino por 100 monosacáridos de glucosa del pululano portador de colesterol y en el que el preparado de vacuna se administra a través de la vía mucosa intranasal.

[2] El preparado de vacuna mucosa para su uso de acuerdo con [1], en el que el antígeno de vacuna se deriva de un microorganismo.

[3] El preparado de vacuna mucosa para su uso de acuerdo con [2], en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en un virus, una bacteria, un protozoo, y un hongo.

[4] El preparado de vacuna mucosa para su uso de acuerdo con [3], en el que el antígeno de vacuna se selecciona del grupo que consiste en una región C-terminal no virulenta de la cadena pesada de la toxina botulínica, del toxoide tetánico y de la molécula antigénica de la membrana del virus del SIDA (gag p24).

[5] El preparado de vacuna mucosa para su uso de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en el que el antígeno de vacuna está combinado con el nanogel a una proporción molar de 1:1 a 1:10.

[6] Un uso de un nanogel y un antígeno de vacuna para la fabricación de un preparado de vacuna para el tratamiento o la prevención de una infección microbiana en el que dicho preparado de vacuna se administra a través de la vía transnasal y en el que el nanogel es pululano portador de colesterol que tiene un grupo funcional catiónico, en el que el grupo funcional catiónico es un grupo amino y en el que el nanogel comprende de 5 a 30 de dichos grupos amino por 100 monosacáridos de glucosa del pululano portador de colesterol.

[7] El uso de [6], en el que el antígeno de vacuna se deriva de un microorganismo.

[8] El uso de [7], en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en un virus, una bacteria, un protozoo, y un hongo.

También se describe en el presente documento el método para producir un preparado de vacuna mucosa que comprende un compuesto del antígeno de vacuna y el nanogel, comprendiendo el método la mezcla de un nanogel que comprende un polisacárido hidrófilo que tiene un grupo funcional catiónico con colesterol hidrófobo añadido al mismo como cadena lateral y un antígeno de vacuna a 4 °C hasta 37 °C durante 2 a 48 horas.

En dicho método, el grupo funcional catiónico puede ser un grupo amino.

En dicho método, el nanogel puede ser pululano portador de colesterol.

En dicho método, el antígeno de vacuna puede derivarse de un microorganismo.

Los microorganismos pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en un virus, una bacteria, un protozoo, y un hongo.

### Efectos de la invención

El preparado de vacuna mucosa de la presente invención preparado mediante la combinación de un antígeno de vacuna y un nanogel catiónico induce eficazmente respuestas inmunitarias sistémicas y de las mucosas en un animal a través de la administración transnasal. La vacuna mucosa de la presente invención implica el uso de nanogeles catiónicos. En consecuencia, los antígenos de vacuna pueden suministrarse eficazmente al sistema inmunitario, y las respuestas inmunitarias se inducen más eficazmente que en el caso en el que se emplean nanogeles no catiónicos o liposomas catiónicos. La vacuna mucosa de la presente invención puede emplearse eficazmente para la prevención o el tratamiento de infecciones víricas o bacterianas de un animal.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el título de anticuerpos de IgG total con respecto a Hc en el suero de un ratón inmunizado por vía transnasal.

La figura 2 muestra los títulos de anticuerpos de IgG1, IgG2a, IgG2b y la IgG3 con respecto a Hc en el suero de un ratón inmunizado por vía transnasal. Las cuatro gráficas de barras alineadas muestran cada una desde la

izquierda la IgG1, IgG2a, IgG2b y la IgG3.

La figura 3 muestra el título de anticuerpos de IgG total con respecto a TT en el suero de un ratón inmunizado por vía transnasal.

5 La figura 4 muestra los títulos de anticuerpos de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 con respecto a TT en el suero de un ratón inmunizado por vía transnasal. Las cuatro gráficas de barras alineadas muestran cada una desde la izquierda la IgG1, IgG2a, IgG2b y la IgG3.

La figura 5 muestra el título de anticuerpos de IgG total con respecto a gag p24 en el suero de un ratón inmunizado por vía transnasal.

10 La figura 6 muestra el título de anticuerpos de IgA con respecto a Hc en la solución de lavado nasal empleada en un ratón inmunizado por vía transnasal.

La figura 7 muestra el título de anticuerpos de IgA con respecto a TT en la solución de lavado nasal empleada en un ratón inmunizado por vía transnasal.

La figura 8 muestra el número de células productoras de IgA específicas del antígeno de Hc en la solución de lavado nasal empleada en un ratón inmunizado por vía transnasal.

15 La figura 9 muestra la viabilidad de un ratón inmunizado por vía transnasal con Hc después de haber administrado por vía intraperitoneal toxinas botulínicas con el paso del tiempo.

La figura 10 muestra la viabilidad de un ratón inmunizado por vía transnasal con Hc después de haber administrado por vía transnasal toxinas progenitoras botulínicas con el paso del tiempo.

20 La figura 11 muestra el título de anticuerpos de IgG total con respecto a la toxina botulínica en el suero de un ratón inmunizado por vía transnasal con nanogeles catiónicos o liposomas catiónicos.

La figura 12 muestra el título de anticuerpos de IgA con respecto a gag p24 en la solución de lavado nasal empleada en un ratón inmunizado por vía transnasal con nanogeles catiónicos o liposomas catiónicos.

La figura 13 muestra los efectos de las vacunas basadas en nanogel catiónico para retener un antígeno en el tejido de la cavidad nasal y la transición del mismo hacia el sistema nervioso central.

25

### Realizaciones preferentes de la invención

De aquí en adelante, la presente invención se describe con detalle.

30 En la presente invención, el término "nanogel" se refiere a una nanopartícula de gel de polímero hidrofobizado que comprende un polisacárido hidrófilo con colesterol hidrófobo añadido al mismo como cadena lateral. Los nanogeles pueden producirse por el método descrito en, por ejemplo, el documento WO 00/12564 (título de la invención: *High-purity polysaccharide containing hydrophobic groups and process for producing the same* (Polisacárido de alta pureza que contiene grupos hidrófobos y proceso para producir el mismo).

35

Al principio, se permite que un hidrato de carbono que contiene un grupo hidroxilo o un esteroil que tiene 12 a 50 átomos de hidrato de carbono reaccione con un compuesto de diisocianato representado por la fórmula  $OCN-R_1-NCO$ , en el que  $R_1$  representa un grupo de hidrato de carbono que tiene 1 a 50 átomos de carbono, para producir un compuesto hidrófobo que contiene un grupo isocianato que ha reaccionado con una molécula de un hidrato de carbono que contiene un grupo hidroxilo o con un esteroil que tiene 12 a 50 átomos de hidrato de carbono. Posteriormente, el compuesto hidrófobo que contiene un grupo isocianato resultante se somete a otra reacción con un polisacárido para producir un polisacárido que contiene un grupo hidrófobo que comprende un hidrato de carbono o grupo esteroil que tiene 12 a 50 átomos de hidrato de carbono como un grupo hidrófobo. El producto de la reacción puede purificarse empleando un disolvente con base de cetona para producir un polisacárido que contiene un grupo hidrófobo de alta pureza. En la presente invención, el polisacárido es pululano.

40

45

El nanogel que se emplea en la presente invención es pululano portador de colesterol (de aquí en adelante denominado como "CHP"). En el CHP, se sustituyen 1 a 10, y preferentemente 1 a varias moléculas de colesterol con pululano que tiene un peso molecular de 30.000 a 200.000 (por ejemplo, 100.000) por 100 unidades de monosacáridos. Las propiedades del CHP pueden modificarse en términos de la cantidad de sustitución de colesterol que depende del tamaño de la proteína o del grado de hidrofobicidad. Para controlar las propiedades hidrófobas del CHP, puede introducirse un grupo alquilo que tenga 10 a 30, y preferentemente aproximadamente 12 a 20 átomos de hidrato de carbono. Los nanogeles empleados en la presente invención tienen un diámetro de partículas de 10 a 40 nm y preferentemente de 20 a 30 nm. Los nanogeles están comercializados ampliamente, y tales nanogeles comercializados pueden emplearse en la presente invención.

50

55

En la presente invención, la vacuna mucosa implica el uso de nanogeles en los que se han introducido grupos funcionales con carga positiva, concretamente grupos amino. El número de grupos amino introducidos en los nanogeles es de 5 a 30 por 100 monosacáridos de glucosa de CHP. Un ejemplo preferente de un método para introducir grupos amino en nanogeles es un método que implica el uso del pululano de colesterol con un grupo amino añadido (CHPNH<sub>2</sub>) descrito anteriormente.

60

El CHP secado a presión reducida (0,15 g) se disuelve en 15 ml de un disolvente de dimetilsulfóxido (DMSO), se añaden al mismo 75 mg de 1-1'-carbonildiimidazol bajo un flujo de nitrógeno, y se permite que transcurra la reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añade lentamente etilendiamina (300 mg) a la solución de reacción, y el resultante se agita durante 24 horas. La solución de reacción se dializa contra agua destilada durante 6 días. El

65

resultante se liofiliza para obtener un sólido opalescente. El grado de sustitución de la etilendiamina se determina mediante un análisis elemental o análisis H-RMN. El número de sustituyentes a introducir puede variar según sea necesario. Variando el número de sustituyentes introducido, puede regularse la magnitud de la carga positiva y puede regularse la eficacia del suministro del antígeno de vacuna del compuesto antígeno de vacuna/nanogel catiónico.

5 El preparado de vacuna mucosa de la presente invención puede inducir eficazmente en animales las respuestas inmunitarias sistémicas y de la mucosa específicas del antígeno sin añadir otro adyuvante mucoso.

10 Entre los ejemplos de antígenos de vacuna empleados para la vacuna mucosa de la presente invención se incluyen antígenos de microorganismos, tales como bacterias, virus, hongos y protozoos, que producen infecciones en animales. Tales antígenos inducen en los animales respuestas inmunitarias específicas del antígeno que pueden emplearse para vacunas, por lo que de esta forma se denominan "antígenos de vacuna".

15 Entre los ejemplos específicos de antígenos microbianos se incluyen los antígenos de proteína de los siguientes microorganismos: virus patógenos, tales como el virus de la gripe A, el virus de la gripe B, el virus de la hepatitis C, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, rotavirus, el citomegalovirus, el virus respiratorio sincicial (VRS), el adenovirus, el VIH, el virus de la varicela-zóster, el virus del herpes simple de tipo 1 y tipo 2, el virus de la leucemia de linfocitos T del adulto (ATL), el virus de Coxsackie, el enterovirus, el virus del exantema súbito (HHV-6), el virus del sarampión, el virus de la rubéola, el virus de las paperas (parotiditis epidémica), el poliovirus, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la rabia, el virus de la hepatitis C, el virus de Norwalk (norovirus), el virus de la rabia, el virus respiratorio sincicial (VRS), el citomegalovirus, el virus de la fiebre aftosa, el virus de la gastroenteritis transmisible, el virus de la rubéola, el virus de la ATL, el adenovirus, el virus de Echo, el virus del herpes, el virus de la viruela, el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla, el virus del Nilo Occidental, el SRAG (coronavirus), el virus de la fiebre hemorrágica del Ébola (filovirus), el virus de Marburgo (filovirus), el virus de Lassa, el hantavirus, y el virus Nipah; bacterias patógenas, tales como la *Escherichia coli* enteropatógena (por ejemplo, la *E. coli* enterohemorrágica), estafilococos (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*), meningococos, *Psuedomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, clamidia, sigela, neumococos, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pestis*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, salmonela, enterococo resistente a la vancomicina (VRE), *Mycobacterium tuberculosis*, sigela, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, clamidia, disentería amebiana, legionela, borreliosis de Lyme, y brucelosis (fiebre de Malta); rickettsia, tal como la fiebre Q de la rickettsia y la clamidia; protozoos, tales como los agentes causantes de la malaria y el criptosporidio; y los hongos, tales como criptococosis y aspergilo. Entre los ejemplos de proteínas derivadas de microorganismos patógenos se incluyen las proteínas o péptidos que constituyen microorganismos patógenos (por ejemplo, proteínas superficiales, proteínas de la cápside, proteínas o péptidos producidos por microorganismos patógenos (por ejemplo, toxinas, enzimas, hormonas, sustancias inmunomoduladoras, receptores, y ligandos de las mismas), y fragmentos o dominios de los mismos. Pueden emplearse los antígenos de proteína capaces de inducir la producción de anticuerpos que pueden atacar y neutralizar los microorganismos anteriormente mencionados. Un antígeno de proteína a emplear no está limitado a un solo tipo, y la vacuna mucosa de la presente invención puede contener una pluralidad de tipos de antígenos de vacuna derivados de microorganismos homólogos o heterólogos. En el caso del virus de la gripe, por ejemplo, el receptor de la hemaglutinina (HA) y el receptor de la neuraminidasa (NA), ya sea uno o ambos, pueden combinarse con un nanogel catiónico para producir una vacuna mucosa. Los antígenos de vacuna pueden obtenerse de los microorganismos a través del procesamiento, purificación, u otros medios. Además, los antígenos de vacuna pueden sintetizarse químicamente o pueden obtenerse en forma de proteínas recombinantes a través de su modificación por ingeniería genética. El peso molecular de los antígenos de vacuna contenidos en el preparado de vacuna mucosa de la presente invención no está limitado. Por ejemplo, es de aproximadamente 500 a 1.000.000, y preferentemente de aproximadamente 1.000 a 200.000.

50 El compuesto de antígeno de vacuna/nanogel catiónico puede prepararse produciendo interacciones entre los nanogeles catiónicos y los antígenos de vacuna, de modo que los antígenos de vacuna se incorporan a los nanogeles catiónicos. La preparación de un compuesto se denomina "formación del compuesto". La proporción de mezcla de los antígenos de vacuna con respecto a los nanogeles catiónicos puede determinarse adecuadamente de conformidad con los tipos de antígenos de vacuna y nanogeles catiónicos empleados. Por ejemplo, el  $\text{CHPNH}_2$  puede mezclarse con antígenos de vacuna a una proporción molar de 1:1 a 1:100, y preferentemente de 1:1 a 1:10.

60 Un compuesto de antígeno de vacuna/nanogel catiónico puede prepararse mediante, por ejemplo, la mezcla de antígenos de vacuna con nanogeles catiónicos en una solución tamponada y permitiendo que la mezcla repose a 4 °C hasta 37 °C durante 2 hasta 48 horas, y preferentemente durante 20 hasta 30 horas. Una solución tamponada empleada para la preparación de un compuesto de antígeno de vacuna/nanogel catiónico puede prepararse adecuadamente de conformidad con los tipos de proteína y nanogel. Un ejemplo es una solución tamponada Tris-HCl (50 mM, pH 7,6). El compuesto resultante de antígeno de vacuna/nanogel puede analizarse de conformidad con una técnica convencional, tal como la cromatografía de permeación en gel (CPG), la microscopía de fuerza atómica (AFM), la microscopía de fluorescencia, o la microscopía de fluorescencia confocal.

65 El preparado de vacuna mucosa de la presente invención se administra por vía transnasal a través de una vía

mucosa, es decir, a través de la membrana mucosa de la cavidad nasal. Los preparados de vacunas nasales inducen las respuestas inmunitarias en la cavidad nasal mediante la administración transnasal. Específicamente, tales preparados de vacunas son capaces de inducir respuestas inmunitarias locales en la membrana mucosa de las vías respiratorias (de las vías respiratorias altas, en particular), que es la vía de la infección microbiana que produce las infecciones víricas u otras infecciones. Los preparados de vacunas nasales pueden administrarse en la cavidad nasal mediante, por ejemplo, pulverización, recubrimiento o goteo. Los preparados de vacunas mucosas, tales como preparados orales o transnasales, permanecen en la membrana mucosa, en el tejido linfático asociado a las mucosas (MALT), o en el tejido linfático asociado al intestino (GALT), y liberan los antígenos de vacuna. Tanto los preparados de vacunas nasales como los preparados de vacunas orales inducen respuestas inmunitarias sistémicas, producen IgG específica de virus o similares en los organismos, inducen respuestas inmunitarias de las mucosas, producen anticuerpos de IgA en la membrana mucosa y bloquean las infecciones a través de mecanismos inmunitarios sistémicos y de las mucosas. De este modo, pueden tratarse las infecciones.

Un preparado de vacuna mucosa puede contener estabilizantes farmacéuticamente aceptables, antisépticos, antioxidantes y similares, conocidos. Entre los ejemplos de estabilizantes se incluyen la gelatina, el dextrano y el sorbitol. Entre los ejemplos de antisépticos se incluyen el timerosal y la  $\beta$ -propiolactona. Un ejemplo de antioxidante es el  $\alpha$ -tocoferol.

El preparado de vacuna mucosa de la presente invención puede administrarse a, por ejemplo, a mamíferos, tales como seres humanos, monos, ratones, ratas, conejos, gatos, ganado bovino, perros, caballos y cabras, y a aves, tales como pollos.

Una dosis del preparado de la vacuna mucosa puede determinarse adecuadamente en función del tipo de inmunógeno, la edad o el peso corporal de un sujeto, y otras condiciones. El preparado de vacuna mucosa contiene cantidades farmacéuticamente eficaces de antígenos de vacuna. La expresión "cantidad(es) farmacéuticamente eficaz(es)" se refiere a una cantidad de un antígeno que es necesaria para inducir las respuestas inmunitarias a un antígeno de vacuna. Por ejemplo, una dosis de varios  $\mu$ g hasta varias decenas de mg de un antígeno de vacuna puede administrarse desde una vez hasta varias veces al día, y la administración puede tener lugar varias en intervalos de 1 a varias semanas (por ejemplo, la administración puede tener lugar de 1 a 5 veces).

### Ejemplos

La presente invención se describe con detalle con relación a los siguientes ejemplos, a pesar de que el alcance técnico de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

#### Ejemplo 1: Preparación de la vacuna mucosa

Se emplearon nanogeles catiónicos (CHP catiónico) en los que el grado de sustitución del colesterol fue de 1,4 y el grado de sustitución de la etilendiamina fue de 18 por 100 monosacáridos (nanogeles de CHPNH<sub>2</sub>). Un CHP derivado o pululano catiónico se disolvió en una solución tamponada (PBS) de fosfato de 1 mg/ml. Los nanogeles de CHPNH<sub>2</sub> se sometieron a ultrasonidos durante 15 minutos y después se filtraron a través de un filtro de 0,22 mm.

Se mezcló la región C-terminal no virulenta de una cadena pesada de la toxina botulínica (Hc; peso molecular: 45.000), el toxoide tetánico (TT; peso molecular: 150.000), o la molécula antigénica de la membrana del virus del SIDA (gag p24; peso molecular:

24.000) expresada en *E. coli*. y purificada, se mezcló con la cantidad equimolar de los nanogeles catiónicos preparados de la manera descrita anteriormente, y la mezcla resultante se sometió a reacción a 45 °C durante 5 horas para preparar un compuesto. El compuesto obtenido de antígeno/nanogel catiónico se empleó como vacuna mucosa empleando nanogeles catiónicos. El gen de la región C-terminal no virulenta purificada de la cadena pesada de la toxina botulínica se insertó en un vector de expresión de la proteína de fusión GST (pGEX-6P3, GE Healthcare), se transformó en *E. coli*. Rosetta 2 (Novagen), y se indujo para que se expresara con la adición de IPTG 0,1 mM. El Hc se centrifugó después de la desintegración ultrasónica de las células suspendidas en el PBS, el sobrenadante resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico (DAEA Sepharose; GE Healthcare), mediante cromatografía de afinidad (Glutathione Sepharose; GE Healthcare), o mediante cromatografía de permeación de gel (Sephacryl S-100; GE Healthcare). La GST unida al extremo N-terminal del Hc se sometió a cromatografía de afinidad y después se retiró mediante ablación con la adición de la proteasa PreScission (GE Healthcare) a la columna. El toxoide tetánico se obtuvo de la organización "Research Foundation for Microbial Diseases" de la universidad de Osaka y el gag p24 se obtuvo de Kyoko Yokota, del departamento "Department of Immunology at the National Institute of Infectious Diseases".

#### Ejemplo 2: Inmunización transnasal

La vacuna mucosa que emplea nanogeles catiónicos preparada en el ejemplo 1, o únicamente el antígeno, se administró a ratones BALB/c (hembras) de 6 a 8 semanas de vida a través de la cavidad nasal en una cantidad de 10  $\mu$ g de Hc (88,9  $\mu$ g de nanogel), 30  $\mu$ g de TT (80,0  $\mu$ g de nanogel), o 10  $\mu$ g de gag p24 (166,7  $\mu$ g de nanogel) por ratón, una vez a la semana (3 veces en total) para inmunizar a los ratones por vía transnasal. La cantidad de

antígenos administrada (es decir, la cantidad de solución) se ajustó a 15 µl en cada grupo experimental, y se administraron 7,5 µl de solución en cada orificio nasal. El PBS se administró como control.

5 La sangre se muestreó antes de la inmunización y una semana después de la inmunización, y se midieron los títulos de anticuerpos de IgG con respecto a la toxina botulínica, el TT, o el gag p24 en la muestra de suero para evaluar las respuestas inmunitarias sistémicas. La cavidad nasal se lavó con 200 µl de PBS una semana después de la inmunización final, y el título de anticuerpos de IgA de la solución del lavado nasal se midió para evaluar las respuestas inmunitarias en el sistema mucoso. El título de anticuerpos se evaluó mediante ELISA. En cuanto al suero de IgG, se midieron los títulos de anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b, e IgG3, y se evaluó el patrón de producción de anticuerpos en el nivel de las subclases para predecir el equilibrio inmunitario de Th1/Th2 tras la inmunización. Así mismo, se evaluó mediante ELISPOT el número de células productoras de IgA específicas del antígeno (células del plasma sanguíneo) en el tejido nasal, una semana después de la inmunización.

15 La figura 1 muestra el título de anticuerpos de IgG total con respecto a la toxina botulínica en el suero. La figura 2 muestra los títulos de anticuerpos de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 con respecto a la toxina botulínica en el suero muestreado tras 3 procedimientos de inmunización. Así mismo, la figura 3 muestra el título de anticuerpos de IgG total con respecto a TT en el suero, la figura 4 muestra los títulos de anticuerpos de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 con respecto a TT en el suero muestreado tras 3 procedimientos de inmunización, y la figura 5 muestra el título de anticuerpos de IgG específico del gag p24 tras 3 procedimientos de inmunización.

20 La figura 6 muestra el título de anticuerpos de IgA con respecto a la toxina botulínica en la solución de lavado nasal tras 3 procedimientos de inmunización, y la figura 7 muestra el título de anticuerpos de IgA con respecto a TT en la solución de lavado nasal tras 3 procedimientos de inmunización.

25 Tal como se muestra en las figuras 1, 3 y 5, los títulos de anticuerpos de IgG totales con respecto a la toxina botulínica, al TT o al gag p24 fueron significativamente más elevados cuando se administraron el compuesto de Hc, de TT o de gag p24 y los nanogeles catiónicos, en comparación con el caso en el que se administró únicamente Hc, TT o gag p24. Esto indica que se inducirían respuestas inmunitarias sistémicas más potentes si se administran el compuesto de Hc, de TT o de gag p24 y los nanogeles catiónicos, en comparación con el caso en el que se administró únicamente Hc, TT o gag p24. Tal como se muestra en las figuras 2 y 4, además, una mayoría de anticuerpos de IgG específicos del antígeno eran de la subclase de IgG1, y el nivel de IgG2a fue significativamente bajo. De este modo, se dedujo que la administración transnasal de un compuesto de antígeno de vacuna/nanogel catiónico induciría eficazmente las respuestas inmunitarias humorales del tipo Th2.

35 Tal como se muestra en las figuras 6 y 7, no se reconoció sustancialmente ningún título de anticuerpos de IgA cuando solo se administró Hc o TT. Sin embargo, cuando se administró un compuesto de Hc o TT y nanogeles catiónicos, se observó un título de anticuerpos de IgA elevado con respecto a la toxina botulínica o al TT. Esto indica que las respuestas inmunitarias de la mucosa se inducirían en la membrana mucosa nasal solo mediante administración transnasal de la vacuna mucosa de la presente invención en forma de compuesto antígeno/nanogel catiónico.

45 La figura 8 muestra una comparación del número de células productoras de IgA específica del antígeno en la membrana mucosa de la cavidad nasal. Como se muestra en la figura 8, no se produjeron células productoras de IgA cuando solo se administró Hc; sin embargo, sí se produjeron células productoras de IgA cuando se administró el compuesto de Hc/nanogel catiónico. Ejemplo 3: Efectos de la neutralización tras la inmunización transnasal empleando la vacuna mucosa que emplea nanogeles

50 Se administró la vacuna que emplea nanogeles catiónicos que emplean una región C-terminal no virulenta de la cadena pesada de la toxina botulínica (Hc; peso molecular: 45.000), como el antígeno preparado en el ejemplo 1, o solo la Hc por vía transnasal a 5 ratones para llevar a cabo la inmunización de la misma manera que en el ejemplo 2. El PBS se administró como control negativo. Después de que los ratones fueran sometidos a la inmunización 3 veces, la toxina botulínica (obtenida gracias al Profesor Shunji Kozaki, Division of Veterinary Science, School of Life and Environmental Sciences, Universidad Prefecture de Osaka) se administró por vía intraperitoneal en una cantidad 25.000 veces mayor que la dosis letal de la misma mediante administración intraperitoneal (por ejemplo, 500 ng) para analizar los efectos de supervivencia. Con el fin de analizar los efectos de neutralización de la IgA específica de la Hc inducida en el tejido nasal, se administraron 10 µg de toxinas progenitoras botulínicas (obtenidas de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) por vía transnasal y también se analizaron los efectos de supervivencia posteriores.

60 La figura 9 muestra la viabilidad de un ratón tras la administración intraperitoneal de la toxina botulínica con el paso del tiempo. Como se muestra en la figura 9, todos los ratones que habían sido inmunizados solo con la Hc murieron en el transcurso de un día; sin embargo, todos los ratones que habían sido inmunizados con el compuesto de Hc/nanogel catiónico seguían vivos 1 semana después. Esto indica que la potente neutralización e inmunización sistémicas serían inducidas mediante administración transnasal del compuesto de Hc/nanogel catiónico.

65 La figura 10 muestra la viabilidad tras la administración transnasal de la toxina progenitora botulínica con el paso del tiempo. Como se muestra en la figura 10, todos los ratones que habían sido inmunizados solo con la Hc murieron en

el transcurso de un día; sin embargo, todos los ratones que habían sido inmunizados con el compuesto de Hc/nanogel catiónico seguían vivos 1 semana después. Esto indica que la IgA mucosa específica de la toxina botulínica inducida mediante administración transnasal de un compuesto de Hc/nanogel catiónico bloquearía eficazmente la infección de las mucosas por *botulinum*.

5 **Ejemplo 4:** Efectos de la vacuna que emplea el nanogel catiónico para inducir la inmunidad en comparación con la vacuna que emplea el liposoma catiónico

10 Se administró la vacuna que emplea nanogeles catiónicos que emplean una región C-terminal no virulenta de la cadena pesada de la toxina botulínica (Hc; peso molecular: 45.000), como el antígeno preparado en el ejemplo 1, o el liposoma catiónico que comprende las mismas cantidades de antígenos del mismo tipo (Project), se administró por vía transnasal a 5 ratones para llevar a cabo la inmunización de la misma manera que en el ejemplo 2. Project se obtuvo de PIERCE.

15 La figura 11 muestra el título de anticuerpos de IgG total con respecto a la toxina botulínica tras 3 procedimientos de inmunización.

20 Como se muestra en la figura 11, el título de anticuerpos de IgG total con respecto a la toxina botulínica fue significativamente mayor que cuando se administró el compuesto de Hc/nanogel catiónico, en comparación con el caso en el que Hc se administró en forma de Hc/liposoma catiónico.

La figura 12 muestra el título de anticuerpos de IgA total con respecto a la toxina botulínica tras 3 procedimientos de inmunización.

25 Como se muestra en la figura 12, el título de anticuerpos de IgA total con respecto a la toxina botulínica fue significativamente mayor que cuando se administró el compuesto de Hc/nanogel catiónico, en comparación con el caso en el que Hc se administró en forma de Hc/liposoma catiónico.

30 **Ejemplo 5:** Efectos de la vacuna que emplea nanogeles catiónicos para retener el antígeno en el tejido nasal y migración al sistema nervioso cerebral

35 Se marcó la región C-terminal no virulenta de la cadena pesada de la toxina botulínica (Hc; peso molecular: 45.000) con <sup>111</sup>In (indio) de conformidad con una técnica conocida con el empleo del anhídrido de DTPA. La eficacia del marcaje fue  $728,3233 \pm 115,3543$  CPM/ng. A continuación, la Hc marcada se combinó con nanogeles. Se les administró a los ratones la vacuna mucosa que emplea nanogeles combinada con la Hc marcada (1.000.000 CPM) o solo la Hc marcada por vía transnasal. Después, la disposición en el cerebro, el bulbo olfativo, la cavidad nasal, el tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), el ganglio linfático cervical y el bazo, se sometió a evaluación de seguimiento empleando un contador gamma. Específicamente, el cerebro, el bulbo olfativo, la cavidad nasal, el tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), el ganglio linfático cervical y el bazo, se extrajeron de los ratones 40 0,17, 1, 6, 12, 24, y 48 horas después de la administración transnasal. Las muestras se pesaron y se midieron los rayos gamma emitidos por las muestras empleando un contador gamma.

45 La figura 13 muestra los resultados de las mediciones de los rayos gamma en el cerebro (A), el bulbo olfativo (B), el tejido nasal (C), el tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) (D), el ganglio linfático cervical (E), y el bazo (F).

50 Como se muestra en la figura 13, las vacunas mucosas que emplean nanogeles permanecieron, particularmente en el tejido nasal (C), durante un largo periodo de tiempo, a pesar de que no se observó migración al cerebro o al bulbo olfativo. Los resultados demuestran que la administración transnasal de las vacunas mucosas que comprenden nanogeles catiónicos de la presente invención, brinda mayores efectos de retención del antígeno en la cavidad nasal en comparación con un caso en el que solo se administre la vacuna mucosa. Además, los resultados demuestran que tales vacunas mucosas pueden emplearse como preparados para la administración transnasal con una inocuidad y eficacia excelentes, y no migran al sistema nervioso central como lo harían ciertos adyuvantes.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un preparado de vacuna mucosa para su uso en un método de prevención o tratamiento de una infección microbiana, que comprende un compuesto de un nanogel y un antígeno de vacuna, en donde el nanogel es pululano portador de colesterol que tiene un grupo funcional catiónico, en donde el grupo funcional catiónico es un grupo amino y en donde el nanogel comprende de 5 a 30 de dichos grupos amino por 100 monosacáridos de glucosa de pululano portador de colesterol, y en donde el preparado de vacuna se administra por vía de la ruta mucosa transnasal.
- 10 2. El preparado de vacuna mucosa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antígeno de vacuna se deriva de un microorganismo.
- 15 3. El preparado de vacuna mucosa para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en un virus, una bacteria, un protozoo y un hongo.
- 20 4. El preparado de vacuna mucosa para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el antígeno de vacuna se selecciona del grupo que consiste en una región C-terminal no virulenta de la cadena pesada de la toxina botulínica, del toxoide tetánico y de la molécula antigénica de la membrana del virus del SIDA gag p24.
- 25 5. El preparado de vacuna mucosa para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antígeno de vacuna está combinado con el nanogel a una proporción molar de 1:1 a 1:10.
- 30 6. Un uso de un nanogel y un antígeno de vacuna para la fabricación de un preparado de vacuna para el tratamiento o la prevención de una infección microbiana en donde dicho preparado de vacuna se administra por vía de la ruta transnasal y en donde el nanogel es pululano portador de colesterol que tiene un grupo funcional catiónico, en donde el grupo funcional catiónico es un grupo amino y en donde el nanogel comprende de 5 a 30 de dichos grupos amino por 100 monosacáridos de glucosa del pululano portador de colesterol.
7. El uso de la reivindicación 6, en el que el antígeno de vacuna se deriva de un microorganismo.
8. El uso de la reivindicación 7, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en un virus, una bacteria, un protozoo y un hongo.

Fig. 1

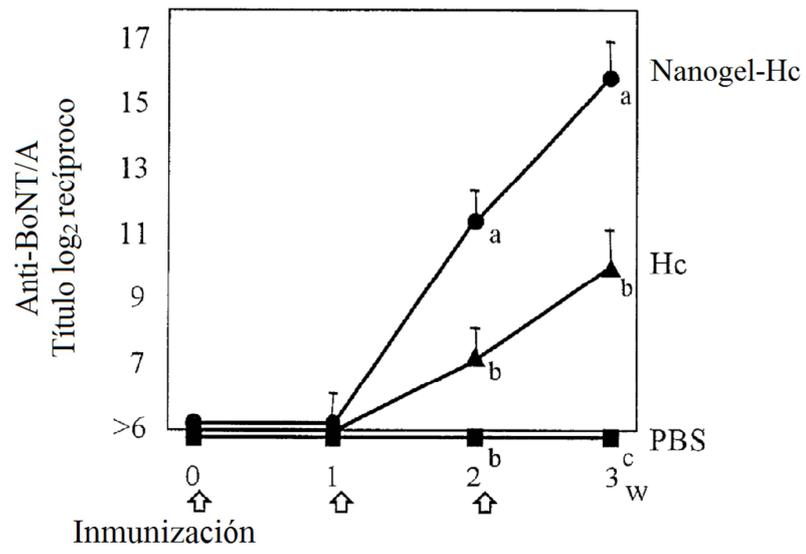


Fig. 2

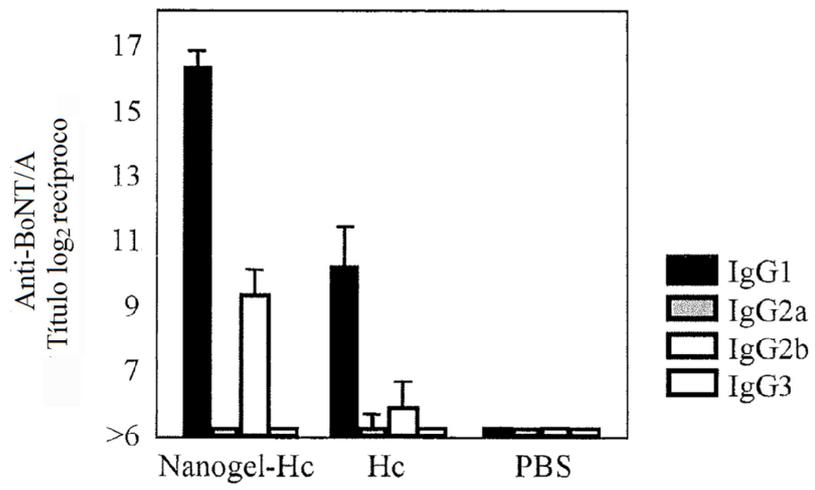


Fig. 3

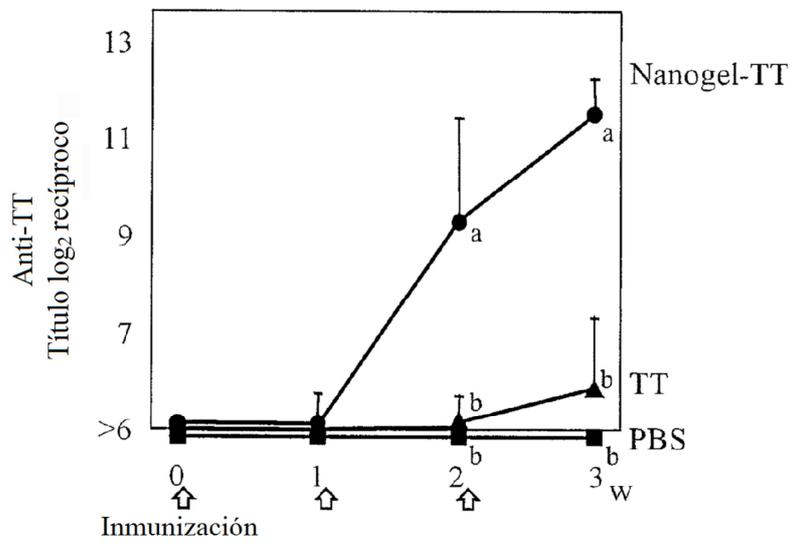


Fig. 4

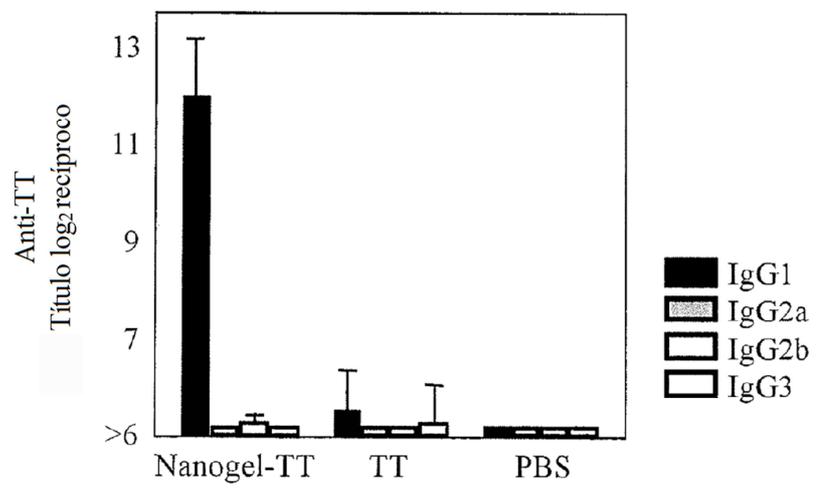


Fig. 5

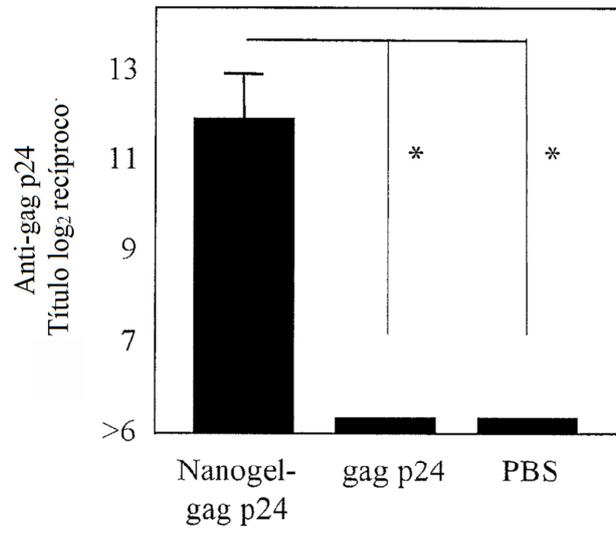


Fig. 6

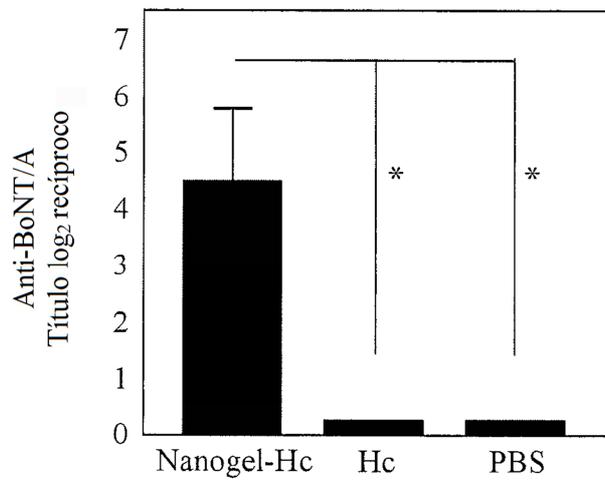


Fig. 7

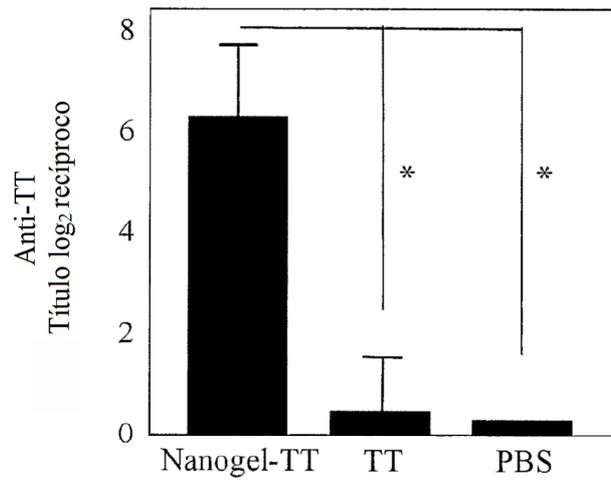


Fig. 8

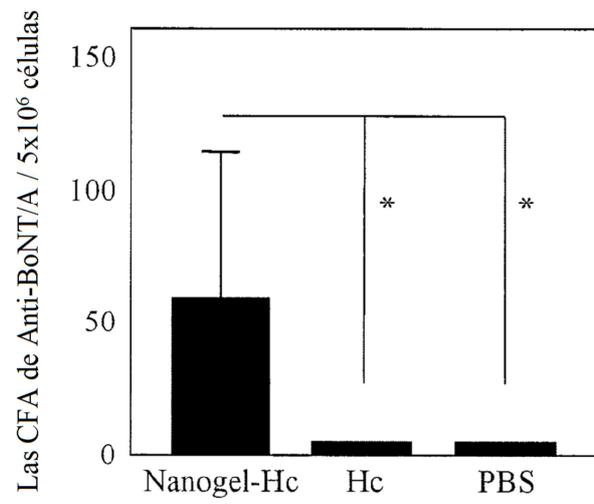


Fig. 9

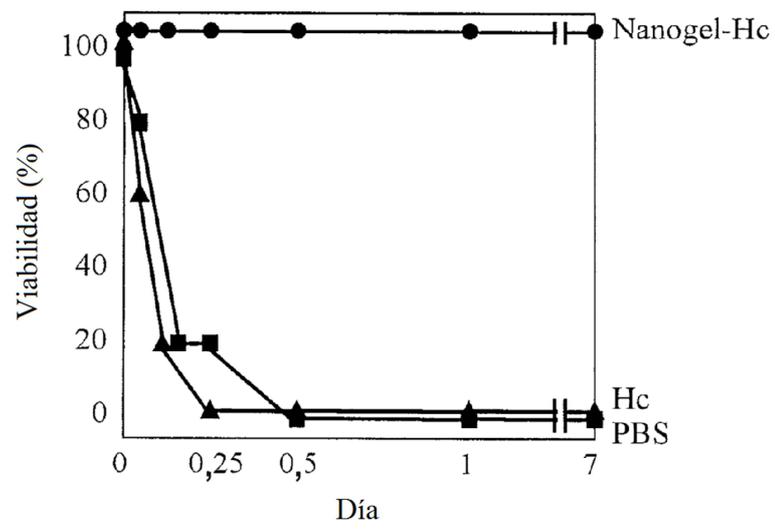


Fig. 10

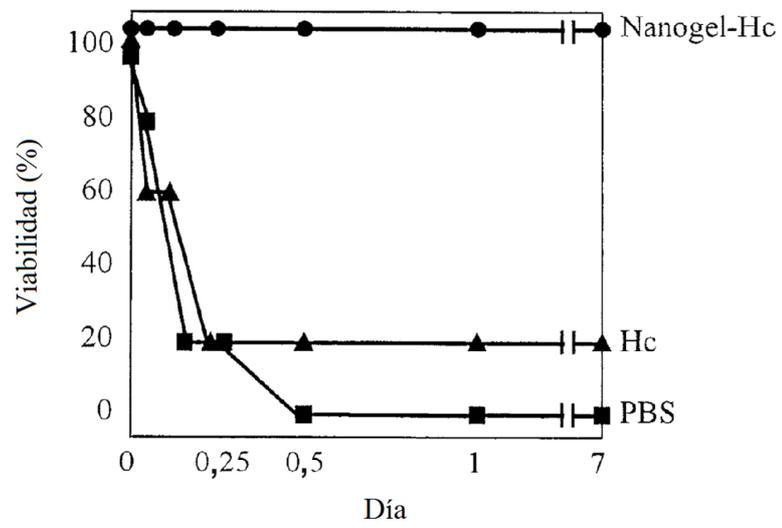


Fig. 11

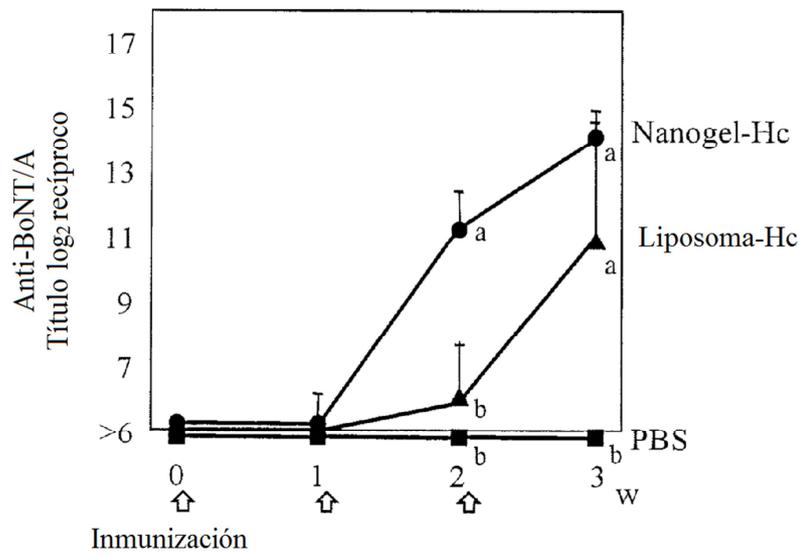


Fig. 12

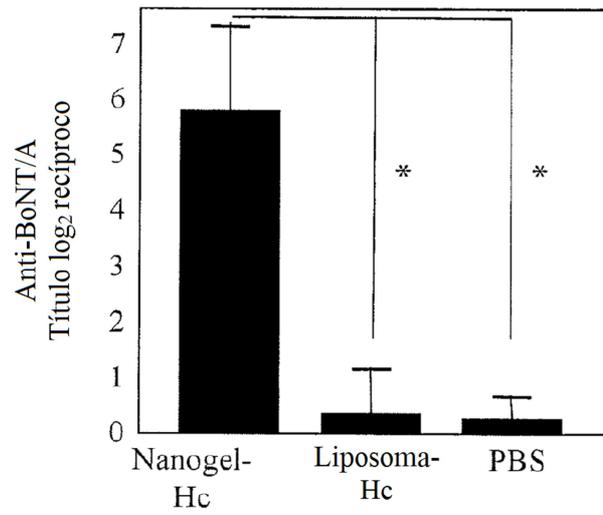


Fig. 13

