

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 636**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 39/39</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/145</b>	(2006.01)
<b>A61P 25/28</b>	(2006.01)
<b>A61P 31/16</b>	(2006.01)
<b>A61P 37/04</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/JP2012/056132**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12124631**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12757500 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2684572**

54 Título: **Composición adyuvante que contiene citrulina**

30 Prioridad:

**11.03.2011 JP 2011053658**

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

**18.11.2019**

73 Titular/es:

**KM BIOLOGICS CO., LTD. (100.0%)  
1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi  
Kumamoto 860-8568, JP**

72 Inventor/es:

**NOZAKI, CHIKATERU;  
KAMINAKA, KAZUYOSHI y  
MATSUDA, JUNICHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 731 636 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición adyuvante que contiene citrulina

- 5 La presente divulgación se refiere a una composición adyuvante que comprende citrulinas, una composición adyuvante que comprende citrulinas y un antioxidante (por ejemplo, ácido ascórbico), y una composición vacunal que comprende la composición adyuvante y un antígeno.

10 Una vacuna puede comprender un adyuvante, un diluyente, un conservante, un agente estabilizante y un tampón junto con una sustancia antigénica. En particular, un adyuvante es una sustancia que se administra junto con un antígeno y puede aumentar la respuesta inmunitaria al antígeno administrado. Un adyuvante puede actuar de distintas maneras dependiendo del tipo que sea, por ejemplo, (1) adsorbe un antígeno para acelerar su captación en las células presentadoras de antígeno; (2) retiene un antígeno en un área local durante un largo periodo de tiempo para liberar gradualmente el antígeno de manera que prolongue la estimulación antigénica; o (3) directamente activa las células inmunocompetentes. Por lo tanto, un adyuvante es muy ventajoso en la reducción de la dosis y número de administraciones de una vacuna o la cantidad de antígeno contenido en una vacuna. Por lo tanto, se han hecho hasta la fecha una variedad de estudios que se refieren a un adyuvante que puede aumentar la acción de una vacuna. Sin embargo, los adyuvantes que se utilizan actualmente en entornos médicos son bastantes pocos El uso de adyuvantes grasos durante la fabricación de vacunas basadas en antígenos que contienen tensioactivos se describe en la Patente de referencia 6.

25 Un adyuvante típico incluye hidróxido de aluminio (al que se hace referencia de aquí en adelante como "adyuvante de aluminio") que se ha utilizado en distintas vacunas. El adyuvante de aluminio, sin embargo, no es un adyuvante ideal desde el punto de vista de que tiene el inconveniente de que difícilmente se puede mezclar de manera uniforme con un antígeno debido a su insolubilidad y no se puede combinar fácilmente en un dispositivo para la administración nasal o transdérmica. Otros adyuvantes distintos al de aluminio son adyuvantes que utilizan el escualeno o MPL (monofosforil lípido). Sin embargo, aunque pueden ejercer una fuerte actividad adyuvante, presentan efectos secundarios graves y tienen la desventaja de ser insolubles en agua. Por lo tanto, en entornos médicos, existe el deseo del desarrollo de un adyuvante que pueda inducir una elevada reacción inmunológica en el cuerpo humano, que tenga pocos efectos secundarios adversos, y presente una mayor comodidad.

30 Por otra parte, la citrulina, un tipo de aminoácido, es uno de los compuestos que constituyen el ciclo de la urea y es prevalente entre los animales, en particular, los mamíferos [Fórmula química:  $C_6H_{13}N_3O_3$ , ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)-pentanoico, Peso molecular: 175,2 g/mol]. Se descubrió la citrulina en la sandía en Japón en 1930 y se denominó así por el nombre científico de la sandía, *Citrullus vulgaris*.

35 Aunque la citrulina no es un aminoácido constituyente de proteínas en el cuerpo vivo, es uno de los compuestos intermediarios del ciclo de la urea. La citrulina se produce a partir de arginina junto con óxido de nitrógeno (NO) que se conoce como una sustancia con actividad vasodilatadora y se condensa con ácido aspártico para regenerar arginina. La citrulina se conoce por presentar actividades útiles tales como la aceleración del metabolismo de amonio (Referencia no patente 1), mejorar el flujo sanguíneo debido a la vasodilatación (Referencia no patente 2), la disminución de la presión sanguínea (Referencia no patente 3), la neurotransmisión (referencia no patente 4) y la eliminación de oxígeno activo (Patente de referencia 1).

40 Por lo tanto, la citrulina se ha aprobado como material alimentario tal como un suplemento en Japón en 2007. La citrulina se había utilizado en el extranjero antes. La citrulina está disponible en el mercado como suplemento para mejorar el flujo sanguíneo, la prevención de arteriosclerosis y el aumento de energía en los EE. UU. y el malato de citrulina está disponible en el mercado como medicamento para la recuperación de la fatiga en Europa.

45 A pesar de que se han expuesto una variedad de actividades de la citrulina, no se sabe que la citrulina tiene una actividad adyuvante. No se ha informado de ninguna vacuna que comprenda citrulina y un antígeno, así como de ningún adyuvante que comprenda citrulina. Tampoco se ha informado de que se haya descubierto que la citrulina y un antioxidante se puedan utilizar juntos como un adyuvante.

55 Patente de referencia 1: Publicación de Patente Japonesa N.º 2002-226370

Patente de referencia 2: Publicación de Patente Japonesa N.º 53-075387

Patente de referencia 3: Publicación de Patente Japonesa N.º 63-068091

Patente de referencia 4: Documento WO 2011024748

Patente de referencia 5: Documento WO 2008133208

60 Patente de referencia 6: Documento WO 2007015167

Referencia no patente 1: Cell Biochemistry and Function, "Effect of arginine, ornithine and citrulline supplementation upon performance and metabolism of trained rats", 2003, Vol. 21, p. 85-91

Referencia no patente 2: European Journal of Pharmacology, "L-Citrulline mediated relaxation in the control and lipopolysaccharide-treated rat aortic rings", 2001, Vol. 431, p. 61-69

65 Referencia no patente 3: Journal of Clinical Investigation, "L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats", 1991, Vol. 88, p. 1559-1567

Referencia no patente 4: Gastroenterology, "L-citrulline recycling in opossum internal anal sphincter relaxation by nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation", 1997, Vol. 112, p. 1250-1259

Referencia no patente 5: The Journal of Biological Chemistry, "A SIMPLE SYNTHESIS OF dl-CITRULLINE", 1938, Vol. 122, p. 477-p. 484

5 Referencia no patente 6: The Journal of Organic Chemistry, "THE SYNTHESIS OF d, l-CITRULLINE FROM NON-BIOLOGICAL PRECURSORS", 1941, Vol. 6, p. 410-416

**(Problema técnico por resolver)**

10 Los presentes inventores han investigado un adyuvante que evite los inconvenientes del adyuvante de aluminio (inconvenientes debidos a la insolubilidad, etc.) y de los nuevos adyuvantes tales como el escualeno (con efectos secundarios adversos graves). Por lo tanto, la presente invención aspira a proporcionar una adyuvante que pueda aumentar la inmunogenicidad de un antígeno, sea altamente seguro para el cuerpo humano y tenga una mayor comodidad.

15

**(Medio para resolver los problemas)**

20 En vista de las circunstancias anteriores, los presentes inventores han estudiado seriamente un adyuvante que pueda ejercer una actividad productora de anticuerpos suficiente, sea altamente segura y tenga una mayor comodidad y como resultado han descubierto un hallazgo extremadamente nuevo, no publicado hasta ahora de que la citrulina puede ejercer una actividad adyuvante excelente. Además, la citrulina, como sustancia hidrosoluble, puede componerse fácilmente con un antígeno y es altamente segura ya que está contenida en el cuerpo vivo de mamíferos o en una variedad de productos alimentarios. Por lo tanto, es posible proporcionar una vacuna o un adyuvante que sea excelente en la actividad de producción de anticuerpo, en seguridad y comodidad utilizando citrulina. La presente invención se refiere a las realizaciones que se definen en las reivindicaciones.

25

30 Un aspecto de la invención se refiere a una vacuna para su uso en el aumento de la respuesta inmunológica contra un antígeno, donde la vacuna comprende el antígeno y un adyuvante, y donde el adyuvante comprende citrulinas que son el ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)-pentanoico, que tiene la fórmula química  $C_6H_{13}N_3O_3$ . Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una citrulina para su uso como un adyuvante que se va a administrar junto con un antígeno y aumenta la respuesta inmunológica contra el antígeno, donde la citrulina es ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)-pentanoico, que tiene la fórmula química  $C_6H_{13}N_3O_3$ . También se desvela en el presente documento lo siguiente:

- 35 [1] Una composición adyuvante que comprende citrulinas.  
 [2] La composición adyuvante de acuerdo con [1] donde dichas citrulinas son una o más seleccionadas de entre el grupo que consiste en L-citrulina, D-citrulina, L-tiocitrulina, L-tiohomocitrulina, S-metil-L-tiocitrulina y S-etil-L-tiocitrulina.  
 [3] La composición adyuvante de acuerdo con [2] donde dichas citrulinas son L-citrulina o D-citrulina.  
 40 [4] La composición adyuvante de acuerdo con cualquiera de [1] a [3] donde dichas citrulinas están contenidas a 1 mg/ml a 50 mg/ml.  
 [5] La composición adyuvante de acuerdo con cualquiera de [1] a [4] que es para un antígeno peptídico.  
 [6] La composición adyuvante de acuerdo con cualquiera de [1] a [5] que comprende adicionalmente un antioxidante.  
 45 [7] La composición adyuvante de acuerdo con [6] donde dicho antioxidante es el ácido ascórbico.  
 [8] La composición adyuvante de acuerdo con [6] o [7] donde la relación de peso de dichas citrulinas y dicho antioxidante es de 1:2 a 2:1.  
 [9] La composición adyuvante de acuerdo con cualquiera de [6] a [8] que comprende dicho antioxidante de 1 a 10 mg/ml.  
 50 [10] Una composición vacunal que comprende la composición adyuvante que comprende citrulinas como se expone en cualquiera de [1] a [9] y un antígeno.  
 [11] La composición vacunal de acuerdo con [10] donde la relación de peso de dicho antígeno y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 100 o más.  
 [12] La composición vacunal de acuerdo con [10] donde dicho antígeno es del virus de la gripe.  
 55 [13] La composición vacunal de acuerdo con [12] donde dicho antígeno del virus de la gripe es al menos uno o dos o más seleccionados de entre el grupo que consiste en hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), matriz 1 (M1), matriz 2 (M2) y proteína nuclear (NP).  
 60 [14] La composición vacunal de acuerdo con [13] donde dicho antígeno del virus de la gripe es hemaglutinina (HA).  
 [15] La composición vacunal de acuerdo con [13] donde dicho antígeno del virus de la gripe es matriz 2 (M2).  
 [16] La composición vacunal de acuerdo con cualquiera de [12] a [15] donde la relación de peso molecular de dicho antígeno del virus de la gripe y dichas citrulinas es 1:N donde N es 300 o más.  
 65 [17] La composición vacunal de acuerdo con [10] donde dicho antígeno es un péptido.  
 [18] La composición vacunal de acuerdo con [17] donde la relación de peso de dicho péptido y dichas citrulinas

es de 1:N

donde N es 100 o más.

[19] La composición vacunal de acuerdo con [17] donde dicho péptido es un péptido M2e, un péptido M2e con adición o inserción de una o varias cisteínas, o un péptido M2e con adición de un péptido que contiene cisteína.

[20] La composición vacunal de acuerdo con [19] donde dicho péptido es un péptido sintético preparado insertando un resto de cisteína en las posiciones entre N.º 20 y N.º 21, entre N.º 21 y N.º 22, y entre N.º 22 y N.º 23, respectivamente, contando desde el extremo N de un péptido M2e.

[21] La composición vacunal de acuerdo con [19] o [20] donde la relación de peso de dicho péptido M2e y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 200 o más.

[22] La composición vacunal de acuerdo con [17] donde dicho péptido es un péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ), un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de una parte del péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) o dichos péptidos con adición o inserción de una o varias cisteínas.

[23] La composición vacunal de acuerdo con [22] donde dicho péptido es un péptido que consiste en 28 restos de aminoácidos contando desde el extremo N de un péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ), hasta el extremo C en el cual se añade un resto de cisteína.

[24] La composición vacunal de acuerdo con [22] o [23] donde la relación de peso molecular de dicho péptido amiloide  $\beta$  y dichas citrulinas es 1:N donde N es 100 o más.

[25] La composición vacunal de acuerdo con [10] donde dicho antígeno es un péptido de al menos uno o dos o más de una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

[26] Un procedimiento para la preparación de una vacuna con una mayor capacidad para producir un anticuerpo contra un antígeno contenido en dicha vacuna, que comprende citrulinas añadidas como adyuvante de la vacuna.

[27] El procedimiento de acuerdo con [26] donde dichas citrulinas son una o dos o más seleccionadas de entre el grupo que consiste en L-citrulina, D-citrulina, L-tiocitrulina, L-tiohomocitrulina, S-metil-L-tiocitrulina y S-etil-L-tiocitrulina.

[28] El procedimiento de acuerdo con [27] donde dichas citrulinas son L-citrulina o D-citrulina.

[29] El procedimiento de acuerdo con cualquiera de [26] a [28] donde dichas citrulinas se añaden a 1 mg/ml a 50 mg/ml.

[30] El procedimiento de acuerdo con [26] a [29] donde la relación de peso de dicho péptido y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 100 o más.

[31] El procedimiento de acuerdo con [26] a [29] donde dicho antígeno es un antígeno del virus de la gripe.

[32] El procedimiento de acuerdo con [31] donde dicho antígeno del virus de la gripe es al menos uno o dos o más seleccionados de entre el grupo que consiste en hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), matriz 1 (M1), matriz 2 (M2) y proteína nuclear (NP).

[33] El procedimiento de acuerdo con [32] donde dicho antígeno del virus de la gripe es hemaglutinina (HA).

[34] El procedimiento de acuerdo con [32] donde dicho antígeno del virus de la gripe es matriz 2 (M2).

[35] El procedimiento de acuerdo con cualquiera de [31] a [34] donde la relación de peso de dicho antígeno del virus de la gripe y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 300 o más.

[36] El procedimiento de acuerdo con [26] donde dicho antígeno es un péptido.

[37] El procedimiento de acuerdo con [36] donde la relación de peso de dicho péptido y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 100 o más.

[38] El procedimiento de acuerdo con [36] donde dicho péptido es un péptido M2e, un péptido M2e con adición o inserción de una o varias cisteínas, o un péptido M2e con adición de un péptido que contiene cisteína.

[39] El procedimiento de acuerdo con [38] donde dicho péptido es un péptido sintético preparado insertando un resto de cisteína en las posiciones entre N.º 20 y N.º 21, entre N.º 21 y N.º 22, y entre N.º 22 y N.º 23, respectivamente, contando desde el extremo N de un péptido M2e.

[40] El procedimiento de acuerdo con [38] a [39] donde la relación de peso de dicho péptido M2e y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 200 o más.

[41] El procedimiento de acuerdo con [36] donde dicho péptido es un péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ), un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de una parte del péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ), o dichos péptidos con adición o inserción de una o varias cisteínas.

[42] El procedimiento de acuerdo con [41] donde dicho péptido es un péptido que consiste en 28 restos de aminoácidos contando desde el extremo N de un péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ), hasta el extremo C en el cual se añade un resto de cisteína.

[43] El procedimiento de acuerdo con [41] o [42] donde la relación de peso de dicho péptido amiloide  $\beta$  y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 100 o más.

[44] El procedimiento de acuerdo con [26] donde dicho antígeno es un péptido que consiste en al menos una o dos o más de una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

[45] El procedimiento de acuerdo con cualquiera de [26] a [44] que también comprende un antioxidante además de las citrulinas.

[46] El procedimiento de acuerdo con [45] donde dicho antioxidante es el ácido ascórbico.

[47] El procedimiento de acuerdo con [45] o [46] donde dichas citrulinas y dicho antioxidante se añaden con una relación de peso de 1:2 a 2:1.

[48] El procedimiento de acuerdo con cualquiera de [45] a [47] donde dicho antioxidante se añade de 1 a

10 mg/ml.

[49] El uso de las citrulinas como un adyuvante.

[50] El uso de acuerdo con [49] donde dichas citrulinas son una o dos o más seleccionadas de entre el grupo que consiste en L-citrulina, D-citrulina, L-tiocitrulina, L-tiohomocitrulina, S-metil-L-tiocitrulina y S-etil-L-tiocitrulina.

[51] El uso de acuerdo con [50] donde dichas citrulinas son L-citrulina o D-citrulina.

[52] El uso de acuerdo con cualquiera de [49] a [51] donde dichas citrulinas se añaden a una vacuna a 1 mg/ml a 50 mg/ml.

[53] El uso de acuerdo con cualquiera de [49] a [52] en el cual también se utiliza un antioxidante.

[54] El uso de acuerdo con [53] donde dicho antioxidante es el ácido ascórbico.

[55] El uso de acuerdo con [53] o [54] donde dichas citrulinas y dicho antioxidante se añaden a una vacuna con una relación de peso de 1:2 a 2:1.

[56] El uso de acuerdo con cualquiera de [53] a [55] donde dicho antioxidante se añade a una vacuna de 1 a 10 mg/ml.

De acuerdo con la presente divulgación, administrando las citrulinas y un antígeno juntos, es posible aumentar la inmunogenicidad en comparación con la administración del antígeno solo. Se ha descubierto que las citrulinas ejercen un efecto de producción de anticuerpos en la misma extensión que el adyuvante convencional (adyuvante de aluminio) y un efecto de producción de anticuerpos mayor que el adyuvante de aluminio cuando el antígeno es un péptido. Se ha descubierto adicionalmente que se mejoraba el efecto de producción de anticuerpos utilizando una combinación de citrulinas y un antioxidante (por ejemplo, el ácido ascórbico) como adyuvante en comparación con el uso de citrulinas solas como adyuvante.

Además, como la citrulina es una sustancia hidrosoluble naturalmente presente en el cuerpo vivo, puede componerse fácilmente con un antígeno en comparación con al adyuvante convencional de aluminio y los adyuvantes oleosos para reducir de esta manera el riesgo de efectos secundarios adversos. Por lo tanto, una composición adyuvante que comprende citrulinas y una composición vacunal de la presente divulgación tienen una mayor comodidad y son altamente seguras para el cuerpo humano. Además, como las citrulinas se pueden producir en producción en masa mediante síntesis química o microorganismos, se pueden proporcionar como adyuvante de una vacuna en una escala de producción de preparaciones farmacéuticas.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados de medición del título de anticuerpo contra el antígeno HA cuando la citrulina se administra a ratones a

1 a 5 mg/cuerpo.

La Fig. 2 muestra los resultados de medición del título de anticuerpo contra M2e cuando la citrulina se administra a ratones a 4 mg/cuerpo.

La primera realización de la presente divulgación es una composición adyuvante que comprende citrulinas.

Las citrulinas contenidas en una composición adyuvante de la presente divulgación incluyen citrulina, derivados de citrulina y una sal de citrulina. La citrulina incluye L-citrulina y D-citrulina, preferentemente L-citrulina. Los derivados de citrulina incluyen L-tiocitrulina, L-tiohomocitrulina, S-metil-L-tiocitrulina y S-etil-L-tiocitrulina. Por lo tanto, las citrulinas de la presente divulgación incluyen L-citrulina, D-citrulina, L-tiocitrulina, L-tiohomocitrulina, S-metil-L-tiocitrulina y S-etil-L-tiocitrulina.

Las citrulinas contenidas en una composición adyuvante de la presente divulgación pueden ser una sal de citrulina. Una sal de citrulina incluye una sal por adición de un ácido, una sal metálica, una sal de amonio, una sal por adición de una amina orgánica, una sal por adición de un aminoácido, y similares. La sal por adición de un ácido incluye una sal de un ácido inorgánico tal como un hidrocloreto, sulfato, nitrato y fosfato y una sal de un ácido orgánico tal como acetato, maleato, fumarato, citrato, malato, lactato,  $\alpha$ -cetoglutarato, gluconato y caprilato. Una sal metálica incluye una sal de un álcali metálico tal como una sal de sodio y una sal de potasio; una sal de un metal alcalinotérreo tal como una sal de magnesio y una sal de calcio; una sal de aluminio, una sal de zinc, y similares. Una sal de amonio incluye una sal de amonio, tetrametilamonio, y similares. Una sal por adición de una amina orgánica incluye una sal de morfolino, piperidina, y similares. Una sal por adición de aminoácido incluye una sal de glicina, fenilalanina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, y similares.

Las citrulinas se pueden obtener por síntesis química, fermentación, y similares. La síntesis química de citrulina incluye, por ejemplo, las que se describen en Gastroenterology, 1997, Vol. 112, p. 1250-1259 (referencia no patente 4:) y The Journal of Biological Chemistry, 1938, Vol. 122, p. 477-p. 484 (referencia no patente 5). La producción por fermentación de L-citrulina incluye, por ejemplo, las que se desvelan en la Publicación de Patente Japonesa N.º 53-075387 (patente de referencia 2) y la publicación de Patente Japonesa N.º 63--068091 (Patente de referencia 3). Las citrulinas también se obtienen adquiriendo productos disponibles en el mercado, incluyendo a modo de ejemplo L-citrulina (Sigma-Aldrich: Código N.º 27510 y C7629, L-tiocitrulina (Sigma Aldrich: Código N.º 88544, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.: Código N.º 205-13861) y S-metil-L-tiocitrulina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.: Código N.º 139-12611).

Una concentración de citrulinas en una composición adyuvante de la presente divulgación puede variar según sea apropiado dependiendo del tipo de antígeno, la forma de dosificación, la vía de administración, los pacientes y similares. Una composición adyuvante de la presente divulgación puede comprender citrulinas a A mg/ml a B mg/ml donde A y B son números diferentes seleccionados de entre el grupo que consiste en 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100 y donde A es menor que B.

Una dosis de citrulinas que se utilice en una composición adyuvante de la presente divulgación puede variar según sea apropiado dependiendo del tipo de antígeno, la forma de dosificación, la vía de administración, y similares.

Una composición adyuvante de la presente divulgación puede comprender un antioxidante además de las citrulinas. Un antioxidante incluye, por ejemplo, el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatión, N-acetilcisteína, butilhidroxianisol, catequina, quercetina, ácido úrico, bilirrubina, glucosa, flavonoides, ceruloplasmina, albúmina, ferritina, metalotioneína, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión transferasa, catalasa, y tiorredoxina, preferentemente, ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol.

En el caso de que una composición vacunal o una composición de adyuvante comprenda un antioxidante en adición a las citrulinas, la relación de peso de las citrulinas y el antioxidante puede ser de 1:2 a 2:1, preferentemente de 1:1. Una composición adyuvante de la presente divulgación puede comprender un antioxidante a 1 a 10 mg/ml, preferentemente 5 mg/ml.

La segunda realización de la presente divulgación es una composición vacunal que comprende una composición adyuvante que comprende citrulinas y un antígeno.

El antígeno puede ser cualquiera que esté contenido habitualmente en una vacuna incluyendo, por ejemplo, carbohidratos, glucolípidos, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, fosfolípidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, polinucleótidos, oligonucleótidos y derivados de los mismos. Como se utiliza en el presente documento, "péptidos" se refiere a los que consisten en varias decenas de aminoácidos mientras que "polipéptidos" se refiere a los que consisten en varias decenas o más de aminoácidos. Entre los antígenos enumerados anteriormente, las proteínas, polipéptidos y péptidos son preferibles. Los péptidos se pueden utilizar preferentemente como antígenos ya que una composición que adyuvante que comprende citrulinas de la presente divulgación puede ejercer un efecto de producción de anticuerpos especialmente cuando se utilizan péptidos como antígeno.

Un antígeno se puede utilizar por recombinación genética, síntesis química, o a partir de una sustancia de origen natural.

Un antígeno puede ser de agentes patógenos (virus, bacterias, hongos, microorganismos parásitos), partículas tipo virus, virosomas, células cancerosas, alérgenos, o un antígeno derivado de moléculas propias.

Un antígeno derivado de agentes patógenos puede ser una subunidad antigénica, un péptido antigénico, un agente patógeno inactivado, un agente patógeno atenuado o un antígeno recombinante.

Los virus incluyen por ejemplo, el virus de la hepatitis, virus RS, adenovirus, avulavirus, isavirus, virus del moquillo canino, virus de la gripe A-C, virus de arteritis equina, virus ébola, enterovirus, calicivirus, coronavirus, virus de inmunodeficiencia del mono, togotavirus, virus del dengue, togavirus, virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa sinovial aviar, neumovirus aviar (llamado anteriormente virus de la rinotraqueítis del pavo), virus nipah, virus de la enfermedad de Newcastle, neumovirus, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la leucemia felina, virus Norwalk, papilomavirus, papovavirus, virus de para influenza tipos 1-3, parvovirus, picornavirus, citomegalovirus humano, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del síndrome respiratorio reproductor porcino, flavivirus, henipavirus, hepadnavirus, virus del herpes, virus Hendra, poliovirus, virus de la enfermedad de Marek, metaneumovirus, morbilivirus, rinovirus, virus vaccinia, virus de la fiebre amarilla, virus de la rinotraqueítis infecciosa, virus de la peste bovina, virus de rabia, varicelovirus, virus de encefalitis, virus de rubeola, virus del sarampión y virus de las paperas, preferentemente, virus de la gripe.

El virus de la gripe es un virus ARN con envoltura con un tamaño de partícula vírica de aproximadamente 100 nm que pertenece a la familia Orthomyxoviridae y se clasifica en tipo A, B o C dependiendo de la antigenicidad de la proteína interna, entra los cuales el tipo A puede producir infección tanto en el ser humano como en animales y muestra una alta diversidad. El tipo A tiene dos tipos de glicoproteínas de envoltura, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Existen 16 subtipos para la HA y 9 subtipos para la NA debido a la distinción de antigenicidad. Una combinación de estos subtipos da como resultado muchos serotipos del virus de gripe A. Cuando aparece una combinación de subtipos en el virus de gripe que no se produjo en el pasado, la gripe puede llegar a extenderse de manera extrema debido a la falta de inmunidad del mismo, que se llama pandemia de gripe.

El virus de gripe como se utiliza en el presente documento como antígeno puede ser de cualquier tipo, subtipo, o cepa. Un antígeno derivado del virus de gripe incluye HA, NA, M1, M2 y NP, más preferentemente HA y M2. La razón es que una vacuna que comprenda HA como antígeno tendría versatilidad ya que se utiliza HA como antígeno en las composiciones vacunales de gripe convencionales. Además, como se desvela en el documento WO 2011024748

(patente de referencia 4), la proteína M2 con menos mutaciones en su secuencia de aminoácidos entre los virus de gripe puede ser útil desde el punto de vista de que puede dotar de inmunidad contra un amplio intervalo de virus de gripe. La proteína M2 puede ser un péptido que se corresponde con una región que consiste en 23 restos de aminoácidos generados después de retirar el dominio transmembrana hidrófobo de M2 (M2e; SEQ ID NO: 1; extremo N SLLTEVETPIRNEWGCRNCNDSSD extremo C), o el péptido M2e con adición o inserción de 1 o varios restos de cisteína, o el péptido M2e con adición de un péptido que contenga cisteína con el fin de aumentar la antigenicidad del péptido M2e. El péptido M2e modificado con cisteína anterior incluye los péptidos desvelados en WO 2011024748 (patente de referencia 4), específicamente, el péptido sintético M2eC212223 (SEQ ID NO: 2; extremo N SLLTEVETPIRNEWGCRNCDCSCSD extremo C) en el que se inserta el resto de cisteína entre N.º 20 y N.º 21, entre N.º 21 y N.º 22, y entre N.º 22 y N.º 23, respectivamente, contando desde el extremo N de M2e.

Para la preparación de un antígeno del virus de gripe, se puede utilizar cualquier método sin ninguna limitación en particular. Por ejemplo, puede infectarse con una cepa de virus aislada de animales infectados con virus de gripe o pacientes que padecen gripe en huevos de gallina o células para su cultivo de manera convencional y se puede preparar el antígeno a partir de una solución vírica purificada de reserva. De manera alternativa, se puede preparar un antígeno a partir de un virus recombinado genéticamente o un antígeno específico producido o expresado en distintas células.

Una molécula propia para su uso como antígeno incluye el péptido amiloide  $\beta$  o un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos del amiloide  $\beta$ . El péptido amiloide  $\beta$  o un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos del amiloide  $\beta$  pueden ser los péptidos con una adición o inserción de 1 o varios restos de cisteína o con adición de un péptido que contenga cisteína. Estos péptidos incluyen los desvelados en el documento WO 2008133208 (patente de referencia 5) Específicamente, el péptido amiloide  $\beta$  puede ser un péptido amiloide  $\beta$  que consiste en 42 restos de aminoácidos (SEQ ID NO: 3; extremo N DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA extremo C). Un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos del péptido amiloide  $\beta$  puede ser un péptido que consiste en 28 restos de aminoácidos contando desde el extremo N (SEQ ID NO: 4; extremo N DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK extremo C). Un péptido con adición de 1 o varios restos de cisteína puede ser el péptido 28AACys (SEQ ID NO: 5; extremo N DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC extremo C) en el que se ha añadido un resto de cisteína al extremo C de un péptido que consiste en 28 restos de aminoácido contando desde el extremo N.

Las bacterias incluyen, por ejemplo, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Alloicoccus otitis*, Influenza bacteria (incluyendo los clasificables en tipos y los no clasificables en tipos), bacterias *Yersinia*, *Chlamydia psittaci*, *Campylobacter*, *Chlamydia pneumoniae* patógena, especies de *Clostridia*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella cholerae suis*, *Giardia*, bacterias de difteria, especies de *Pseudomonas*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus agalactiae*, *Chlamydia trachomatis*, grupo de *Mycobacterium avium*, *Salmonella typhimurium*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus suis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus somnus*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Moraxella catarrhalis*, *Leptospira interrogans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Shigella*, *Streptococcus equi*, *Escherichia coli*, *Anthrax*, bacterias tifoideas, *Clostridium tetani*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus viridans*, y *Neisseria gonorrhoeae*.

Los parásitos incluyen, por ejemplo, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium*, *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma*, y *Pneumocystis carinii*.

Una concentración de antígeno contenido en una composición vacunal de la presente divulgación puede variar adecuadamente dependiendo del tipo de antígeno, la vía de administración de una composición vacunal, la forma de dosificación y similares.

La relación de peso del antígeno y las citrulinas contenidas en una composición vacunal de la presente divulgación puede ser 1:N donde N es preferentemente 100 o más, 200 o más, 300 o más, 333 o más, 400 o más, 800 o más, 3000 o más, 3333 o más, 6000 o más, 6666 o más, 10000 o más, 13000 o más, 13333 o más, 160000 o más, o 16666 o más. Una relación de peso de un antígeno y las citrulinas también puede ser de 1:A a 1:B donde A y B son números diferentes seleccionados de entre el grupo que consiste en 1100, 200, 300, 333, 400, 800, 3000, 3333, 6000, 6666, 10000, 13000, 13333, 16000 y 16666 y donde A es menor que B.

En el caso en que el antígeno sea una proteína HA, la relación de peso del antígeno y las citrulinas contenidos en una composición vacunal de la presente divulgación puede ser 1:N donde N es preferentemente 300 o más, 333 o más, 3000 o más, 3333 o más, 6000 o más, 6666 o más, 10000 o más, 13000 o más, 13333 o más, 160000 o más, o 16666 o más. Una relación de peso de un antígeno y las citrulinas también puede ser de 1:A a 1:B donde A y B son números diferentes seleccionados de entre el grupo que consiste en 300, 333, 3000, 3333, 6000, 6666, 10000, 13000, 13333, 16000 y 16666 y donde A es menor que B.

65

5 En el caso en que el antígeno sea una proteína HA, la relación de peso del antígeno y las citrulinas contenidos en una composición vacunal de la presente divulgación puede ser 1:N donde N es preferentemente 100 o más, 200 o más, 400 o más, u 800 o más. Una relación de peso de un antígeno y las citrulinas también puede ser de 1:A a 1:B donde A y B son números diferentes seleccionados de entre el grupo que consiste en 100, 200, 400 y 800 y 16666 y donde A es menor que B.

En el caso en que el antígeno sea un péptido M2e, la relación de peso del antígeno y las citrulinas contenidos en una composición vacunal de la presente divulgación puede ser 1:N donde N es preferentemente 200 o más.

10 En el caso en que el antígeno sea un péptido amiloide  $\beta$ , la relación de peso del antígeno y las citrulinas contenidos en una composición vacunal de la presente divulgación puede ser 1:N donde N es preferentemente 100 o más, 200 o más, 400 o más, u 800 o más. Una relación de peso de un antígeno y las citrulinas también puede ser de 1:A a 1:B donde A y B son números diferentes seleccionados de entre el grupo que consiste en 100, 200, 400 y 800 y 16666 y donde A es menor que B.

15 Una dosis de antígeno de una composición vacunal de la presente divulgación puede variar adecuadamente dependiendo del tipo de antígeno, la vía de administración de una composición vacunal, la forma de dosificación y similares.

20 Una composición vacunal de la presente divulgación puede comprender un único antígeno o una combinación de varios antígenos. En el caso de que una composición de la presente divulgación comprenda una combinación de varios antígenos, puede comprender varios antígenos de diferentes tipos del mismo origen vírico o bacteriano o varios antígenos de diferentes orígenes víricos o bacterianos. En el caso de una composición vacunal del virus de la gripe, puede comprender preferentemente diferentes tipos de antígenos del virus de gripe tipo A y tipo B

25 Una forma de dosificación de la composición vacunal puede ser de manera que las citrulinas y el antígeno se formulen en un único envase o la composición adyuvante que comprende citrulinas y la composición inmunogénica que comprende el antígeno se pueden formular en envases separados. Una forma de dosificación tras la formulación puede ser, por ejemplo, un líquido, un polvo (polvo liofilizado, polvo seco), una cápsula, un comprimido, en forma liofilizada, y similares.

30 Una forma de dosificación de una composición adyuvante y una composición vacunal puede ser, por ejemplo, un líquido, un polvo (polvo liofilizado, polvo seco), una cápsula, un comprimido, en forma liofilizada, y similares.

35 Una composición adyuvante y una composición vacunal pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable además de las citrulinas y el antígeno. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier vehículo que se utilice habitualmente para la producción de una vacuna. Específicamente, el vehículo incluye solución salina, solución salina tampón, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico, y una combinación de los mismos. Una composición adyuvante y una composición vacunal pueden comprender adicionalmente un emulsionante, un conservante (por ejemplo, timerosal), un agente de isotonicidad, un regulador del pH y un agente inactivador (por ejemplo, formalina) según sea apropiado.

40 Un objetivo para el que se va a administrar una composición adyuvante y una composición vacunal puede ser un organismo que puede inmunizarse incluyendo un ser humano u otros mamíferos (por ejemplo, animales domésticos, mascotas y animales silvestres).

45 Una vía de administración de una composición adyuvante y una composición vacunal incluye, por ejemplo, la percutánea, sublingual, gotas oculares, intracutánea, intramuscular, oral, enteral, nasal, intravenosa, subcutánea, por inhalación de la boca al pulmón, y similares.

50 Una composición adyuvante y una composición vacunal se pueden administrar con, por ejemplo, un stent, catéter, parche transdérmico, microaguja, dispositivo de liberación sostenida que se puede trasplantar, jeringa, jeringa con microaguja, dispositivo sin aguja, o pulverizador. En el caso de que un antígeno y una composición adyuvante se formulen en envases separados, el antígeno y la composición adyuvante se pueden administrar simultáneamente o uno de ellos se puede administrar seguido por el otro en un intervalo definido.

55 La presente divulgación se explica con mayor detalle por medio de los siguientes Ejemplos, pero no se limita a estos.

#### 60 **Ejemplo 1**

65 Se preparó una solución de citrulina para su uso como adyuvante como se describe posteriormente. Se disolvió L-citrulina (Sigma, C7629-1G) en una solución destilada para inyección (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) con una concentración final de 80 mg/ml. La solución se filtró asepticamente con 0,22  $\mu\text{m}$  y se almacenó a -20 °C mediante liofilización hasta su uso.

## (1) Preparación de una composición que comprende citrulinas

Como antígeno, se preparó un antígeno HA de virus de gripe (cepa: A/Solomon; componente: 1200 µg/ml de HA). El antígeno HA se mezcló con distintas concentraciones de citrulina para preparar las Composiciones 1 a 4 como se muestra en la Tabla 1 (la Composición 1 no contenía citrulina). Como control, se preparó una mezcla del antígeno HA y adyuvante de aluminio (mject Alum (PIERCE) o ALHYDROGEL (BRENNTAG)) (Control en la Tabla 1).

Tabla 1

Grupos de inmunización	Componentes (relación de peso respecto al antígeno)	Dosis	D.O.	
			Media	Error estándar
Composición 1	3 µg/ml de HA	0,3 µg/cuerpo de HA	1,541	0,132
Composición 2	0,1 mg/ml de Citrulina 3 µg/ml de HA (1:33)	10 µg/cuerpo de Citrulina 0,3 µg/cuerpo de HA	1,509	0,300
Composición 3	1 mg/ml de Citrulina 3 µg/ml de HA (1:333)	100 µg/cuerpo de Citrulina 0,3 µg/cuerpo de HA	2,057	0,174
Composición 4	10 mg/ml de Citrulina 3 µg/ml de HA (1:3333)	1000 µg/cuerpo de Citrulina 0,3 µg/cuerpo de HA	2,861	0,038
Control	1 mg/ml de Aluminio 3 µg/ml de HA (1:333)	100 µg/cuerpo Aluminio 0,3 µg/cuerpo de HA	2,938	0,050

## 10 (2) Inmunización de ratones y recuperación de suero

Las composiciones 1 a 4 o la de Control se administraron a ratones a 100 µl por ratón como se describe posteriormente (se describe la dosis por ratón en la Tabla 1). Se pesaron los ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad y se dividieron uniformemente en 4 grupos consistiendo cada grupo en tres ratones. Cada ratón se identificó individualmente con un marcador del animal. El día de la administración de las muestras de ensayo, se tomó sangre del seno orbital de los ratones utilizando un capilar bajo anestesia inhalatoria con isoflurano. Después de la centrifugación se pusieron alícuotas en tubos. Cada muestra de ensayo de 0,1 ml se tomó con jeringas desechables de 1 ml (Terumo) y se administró por vía subcutánea en la parte trasera del cuello de los ratones. El día 14 después de la administración de las muestras de ensayo, los ratones se sometieron a laparotomía bajo anestesia inhalatoria con isoflurano y se tomó toda la sangre de la vena cava caudal en el peritoneo. La sangre se dejó en reposo a temperatura ambiente durante más de 30 minutos y después de centrifugarla (3000 rpm, 10 minutos) se aisló el suero. Se midió un anticuerpo contra el antígeno HA en el suero así obtenido mediante ELISA como se describe posteriormente.

## 25 (3) Medición del título de anticuerpo anti-HA mediante ELISA

Se utilizó el mismo antígeno para la inmunización a 1 µg/ml se puso en la placa de ELISA a 50 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante una noche para la inmovilización por adsorción natural. La placa se lavó con PBS (preparado en el día) tres veces y a esto se le añadió Caseína Blocker™ en PBS (Thermo) a 200 µl/pocillo para la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar la placa con PBS tres veces, se añadieron los antisueros (Día 0, 14) diluido 200 veces con Caseína Blocker™ en PBS a la placa a 50 µl/pocillo para la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con POD (Thermo) diluido 2000 veces con caseína Blocker™ en PBS a 50 µl/pocillo para la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavarlo cuatro veces con PBS, se añadió el sustrato TMB (BioFX) a 50 µl/pocillo para la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N a 50 µl/pocillo para parar la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm.

## (4) Resultados

Los resultados del ELISA se muestran en la Tabla 1. En los grupos de inmunización con citrulina y el antígeno, particularmente en los grupos con la administración de citrulina a 100 µg/cuerpo o 1000 µg/cuerpo, se observaba evidentemente el efecto del adyuvante en comparación con el grupo de administración de un antígeno solo. Específicamente, el efecto de producción de anticuerpos era aproximadamente 1,3 veces mayor para el grupo con la administración de 100 µg/cuerpo de citrulina y aproximadamente de 1,9 veces mayor para el grupo con la administración de 1000 µg/cuerpo de citrulina en comparación con el grupo de administración de un antígeno solo. En particular, se observó un efecto adyuvante para el grupo con administración de 1000 µg/cuerpo de citrulina en la misma extensión que el adyuvante de Aluminio. También se observó que la producción de anticuerpo aumentaba según aumentaba la dosis de citrulina.

50

**Ejemplo 2**

Como se podía ver un efecto adyuvante para la citrulina como se demuestra por los resultados del Ejemplo 1, se investigó su cantidad óptima. En el Ejemplo 1, se descubrió que la dosis de 1000 µg/cuerpo de citrulina presentaba el efecto adyuvante más alto cuando se examinaron dosis variables de 10 a 1000 µg/cuerpo. Por lo tanto, se investigó el efecto con una dosis más alta de citrulina.

(1) Preparación de una composición que comprende citrulinas

10 Con los procedimientos que se describen en el Ejemplo 1, se prepararon las Composiciones 5 a 10 con concentraciones variables de citrulina (Tabla 2; la Composición 5 no contiene citrulina).

Tabla 2

Grupos de inmunización	Componentes (relación de peso respecto al antígeno)	Dosis
Composición 5	3 µg/ml de HA	0,3 µg/cuerpo de HA
Composición 6	10 mg/ml de Citrulina 3 µg/ml de HA (1:3333)	1 mg/cuerpo de Citrulina 0,3 µg/cuerpo de HA
Composición 7	20 mg/ml de Citrulina 3 µg/ml de HA (1:6666)	2 mg/cuerpo de Citrulina 0,3 µg/cuerpo de HA
Composición 8	30 mg/ml de Citrulina 3 µg/ml de HA (1:10000)	3 mg/cuerpo de Citrulina 0,3 µg/cuerpo de HA
Composición 9	40 mg/ml de Citrulina 3 µg/ml de HA (1:13333)	4 mg/cuerpo de Citrulina 0,3 µg/cuerpo de HA
Composición 10	50 mg/ml de Citrulina 3 µg/ml de HA (1:16666)	5 mg/cuerpo de Citrulina 0,3 µg/cuerpo de HA

15 (2) Inmunización de ratones y recuperación de suero

Con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, las Composiciones 5 a 10 se administraron a los ratones a 100 µl por ratón y se recuperaron los sueros (se describe la dosis por ratón en la Tabla 2).

20 (3) Medición del título de anticuerpo anti-HA mediante ELISA

Con los procedimientos de ELISA que se describen en el Ejemplo 1 se midió el título de anticuerpos.

(4) Resultados

25 Los resultados del ELISA se muestran en la Figura 1. En todos los grupos de administración de citrulina, se observó un efecto adyuvante. En este intervalo, se podía ver una dependencia de la dosis hasta cierto punto.

**Ejemplo 3**

30 (1) Preparación de una composición que comprende citrulinas

35 Como antígeno, se utilizó el péptido sintético M2eC212223 (SEQ ID NO: 2; extremo N SLLTEVETPIRNEWGRCNC DCSCSD extremo C) en cuyo resto de cisteína se había insertado entre N.º 20 y N.º 21, entre N.º 21 y N.º 22, y entre N.º 22 y N.º 23, respectivamente, contando desde el extremo N de una región que consiste de 23 restos de aminoácido de la proteína M2 del virus de gripe tipo A cuya región se presenta en la superficie vírica (M2e; SEQ ID NO: 1; extremo N SLLTEVETPIRNEWGRCNDSSD extremo C).

40 Como se describe en el documento WO 2011024748 (patente de referencia 4), se sintetizó el péptido M2eC212223. Los péptidos sintetizados se prepararon a 5 mg/ml con agua destilada sustituida con gas nitrógeno por inyección que contenía 1 mM de EDTA y se almacenó como solución de reserva a menos de -80 °C hasta su uso. Se prepararon la Composición 11 que no contiene citrulina como sustancia de ensayo y la Composición 12 que se mezcló con la solución de citrulina como se preparó en el Ejemplo 1.

Tabla 3

Grupos de inmunización	Componentes (relación de peso respecto al antígeno)	Dosis
Composición 11	200 µg/ml de M2eC212223	20 µg/ml de M2eC212223
Composición 12	40 mg/ml de Citrulina 200 µg/ml de M2eC212223 (1:200)	4 mg/ml de Citrulina 20 µg/ml de M2eC212223

## (2) Inmunización de ratones y recuperación de suero

5

La inmunización de los ratones se llevó a cabo como se describe posteriormente. Se dividieron los ratones BALB/c hembras de 7 semanas de edad en 2 grupos consistiendo cada grupo en cinco ratones. Cada ratón se identificó individualmente con un marcador del animal. Las muestras de ensayo se tomaron en jeringas desechables de 1 ml (Terumo) y se administraron por vía subcutánea en la parte posterior del cuello de los ratones a 0,1 ml por ratón (se describe una dosis por ratón en la Tabla 3). Las muestras de ensayo se administraron dos veces con un intervalo de 2 semanas. Una semana después de la segunda administración, los ratones se sometieron a laparotomía bajo anestesia inhalatoria con Somnopentyl (Kyoritsu Seiyaku Corporation) y se tomó toda la sangre de la vena cava caudal en el peritoneo. El aislamiento de los sueros se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

10

## (3) Medición del título de anticuerpo anti-M2e mediante ELISA

15

Con los procedimientos que se describen en el documento WO 2011024748 (patente de referencia 4), se midió un título de anticuerpos contra M2e en los sueros. Específicamente, se diluyó el M2e con 0,1 M de tampón de carbonato, pH 9 a 2 µg/ml, se añadió a una placa de 96 pocillos (Nunc, Immobilizer Amino) a 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante una noche para la inmovilización. Al día siguiente, se lavó cada pocillo tres veces con 300 µl de tampón de fosfato que contenía 0,05 % de Tween 20 (PBST). Se añadieron a cada pocillo 300 µl/pocillo de monoetanolamina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) diluida con 0,1 M de tampón de carbonato a 10 mM y se dejó en reposo la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la monoetanolamina 10 mM se eliminó suficientemente y las muestras diluidas con PBST se añadieron a 100 µl/pocillo (cada muestra por duplicado). Después de la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora, los sueros añadidos diluidos se desecharon y la placa se lavó tres veces con PBST a 300 µl/pocillo. Después del lavado, la solución de dentro de cada pocillo se eliminó suficientemente y se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con HRP (American Qualax, A131PS) a 100 µl/pocillo para la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, la solución de dilución del anticuerpo marcado se desechó y se lavó la placa dos veces con PBST a 300 µl/pocillo y dos veces con la misma cantidad de agua destilada. Se añadió una solución de sustrato cromogénico TMB+ (Dako) a 100 µl/pocillo para la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos protegido de la luz. Luego se añadió ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo para parar el desarrollo. Se midió la absorbancia a 450 nm (DO450).

20

25

30

## (4) Resultados

35

Los resultados del ELISA se muestran en la Figura 2. El efecto de producción de anticuerpos con el uso de citrulina como adyuvante era unas 14 veces mayor que sin el uso de citrulina. Esto prueba que la citrulina puede presentar un efecto adyuvante no solo contra el antígeno HA del virus de la gripe sino también contra el péptido sintético M2eC212223.

40

**Ejemplo 4**

## (1) Preparación de una composición que comprende citrulinas

45

Como antígeno, se utilizó el péptido sintético 28AACys (SEQ ID NO: 5; Extremo N DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC extremo C) en el que se añadió un resto de cisteína al extremo C de un péptido que consiste en 28 restos de aminoácidos contando desde el extremo N (SEQ ID NO: 4; extremo N DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK extremo C) que era una parte del péptido amiloide β que consiste en 42 restos de aminoácido (SEQ ID NO: 3; extremo N DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA extremo C).

50

El péptido sintético se sintetizó como se describe en el documento WO 2008133208 (patente de referencia 5) (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se preparó a 5 mg/ml con solución salina como una solución de reserva y se almacenaron a menos de -80°C hasta su uso. Para la aplicación, se preparó la solución a 10 µg/cuerpo.

55

Se preparó una solución de citrulina para su uso como adyuvante como se describe posteriormente. La L-citrulina (Sigma, C7629-1G) se disolvió en solución salina (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) a una concentración final de 50 mg/ml. La solución se almacenó a -30°C mediante liofilización hasta su uso. De la misma manera, se disolvió

ácido L-ascórbico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en solución salina (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) a una concentración final de 50 mg/ml. y se almacenó la solución a 4 °C en refrigeración hasta su uso. Como control, se utilizó Aluminio (ALHYDROGEL). La solución de citrulina, 28AACys y la solución de ácido ascórbico se mezclaron para preparar los controles 1 y 2 y las Composiciones 13 a 18 como se muestra en la Tabla 4.

5

Tabla 4

Grupos de inmunización	Componentes (relación de peso respecto al antígeno)	Dosis (200 µl)	Media	Error estándar
Control 1	50 µg/ml de 28AACys	10 µg/ml de 28AACys	425	596
Control 2	5 mg/ml de Aluminio 50 µg/ml de 28AACys (1:100)	1 mg/cuerpo de Aluminio 10 µg/cuerpo de 28AACys	506	533
Composición 13	5 mg/ml de Citrulina 50 µg/ml de 28AACys (1:100)	1 mg/cuerpo de Citrulina 10 µg/cuerpo de 28AACys	4935	3976
Composición 14	10 mg/ml de Citrulina 50 µg/ml de 28AACys (1:200)	2 mg/cuerpo de Citrulina 10 µg/cuerpo de 28AACys	17954	1838
Composición 15	20 mg/ml de Citrulina 50 µg/ml de 28AACys (1:400)	4 mg/cuerpo de Citrulina 10 µg/cuerpo de 28AACys	53450	49062
Composición 16	40 mg/ml de Citrulina 50 µg/ml de 28AACys (1:800)	8 mg/cuerpo de Citrulina 10 µg/cuerpo de 28AACys	60217	39928
Composición 17	5 mg/ml de ácido L-ascórbico 50 µg/ml de 28AACys (1:100)	1 mg/cuerpo de ácido L-ascórbico 10 µg/cuerpo de 28AACys	1639	3013
Composición 18	5 mg/ml de Citrulina 5 mg/ml de ácido L-ascórbico 50 µg/ml de 28AACys (1:100:100)	1 mg/cuerpo de Citrulina 1 mg/cuerpo de ácido L-ascórbico 10 µg/cuerpo de 28AACys	19941	18839

## (2) Inmunización de ratones y recuperación de suero

- 10 La inmunización de los ratones se llevó a cabo como se describe posteriormente. Se dividieron los ratones C57BL/6 machos de 7 semanas de edad en ocho grupos consistiendo cada grupo en cuatro ratones. Cada ratón se identificó individualmente con un marcador del animal. Las composiciones se administraron por vía subcutánea en el abdomen de los ratones utilizando jeringas de 1 ml para tuberculina (Terumo; SS-01T2613S) a 200 µl por ratón (se describe la dosis por ratón en la Tabla 4). Los ratones se inmunizaron dos veces con un intervalo de 2 semanas. El Día 14 después de la segunda inmunización se tomó sangre de la vena cava caudal en el peritoneo bajo anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation; Somnopentyl) y se sacrificaron los ratones. La sangre tomada se transfirió a Microtina (BECTON DICKINSON) y se coaguló suficientemente a temperatura ambiente y luego se centrifugó (5000 rpm, 10 minutos). El suero aislado se dividió en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80°C hasta la medición. Se midieron los anticuerpos contra el péptido Aβ en los sueros mediante ELISA como se describe posteriormente.

## (3) Medición del título de anticuerpo anti-HA mediante ELISA Aβ mediante ELISA

- 25 El péptido Aβ (secuencia de aminoácidos 1-40: extremo N DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 6), Hokkaido System Science Co., Ltd.) se diluyó con 0,1 M de tampón de carbonato, pH 9,6 a 10 µg/ml, se añadió a tiras de 8 pocillos (Nalgen-Nunc, Immobilizer Amino) a 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4°C durante una noche para la inmovilización. Al día siguiente, se lavó cada pocillo tres veces con 300 µl de PBS que contenía un 0,05 % de Tween 20 (PBST). Se añadieron a cada pocillo 300 µl/pocillo de etanolamina 10 mM y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la etanolamina 10 mM se eliminó suficientemente y las muestras diluidas con PBST unas 50 veces a 10000 veces se añadieron a 100 µl/pocillo (cada muestra por duplicado). Después de la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora, los sueros añadidos diluidos se desecharon y la placa se lavó tres veces con PBST a 300 µl/pocillo. Después del lavado, se eliminó suficientemente la solución de lavado de cada pocillo y se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con HRP (American Qualax, A131PS) diluido unas 200 veces con la solución de dilución por muestra a 100 µl/pocillo para la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, la solución de dilución del anticuerpo marcado se desechó y se lavó la placa dos veces con PBST a 300 µl/pocillo y dos veces con la misma cantidad de agua destilada. Se añadió una solución de sustrato cromogénico TMB+ (Dako) a 100 µl/pocillo para la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos protegido de la luz. Luego se añadió ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo para parar el desarrollo. Se midió la absorbancia a 450 nm (DO450).

- 40 Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-Aβ disponible en el mercado (CHEMICON; MAB1560) como suero de referencia. El suero de referencia se diluyó con PBST a 0,156, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 ng/ml para preparar referencias para medir el título de anticuerpo. Cada una de las muestras diluidas por duplicado se midieron por DO450, junto con la medición de anticuerpo IgG anti-Aβ en cada uno de los sueros de ratones de muestra. El título de anticuerpos IgG anti-Aβ en cada uno de los sueros de ratón de muestra se calculó a partir de las unidades de referencia obtenidas y la línea de referencia de DO450.

45

**(4) Resultados**

Los títulos de anticuerpo anti-A $\beta$  calculado en los sueros de ratón en los respectivos grupos de inmunización se muestran en la Tabla 4. Los grupos con administración de citrulina (Composiciones 13-16 y 18) presentaban un mayor efecto de producción de anticuerpos en comparación con el grupo sin administración de adyuvante (Control 1). Específicamente, se observó un efecto de producción de anticuerpo extremadamente mayor aproximadamente de 11,6 veces mayor para el grupo de administración de 1 mg/cuerpo (Composición 13), aproximadamente de 42,2 veces mayor para el grupo con administración de 2 mg/cuerpo (Composición 14), aproximadamente de 125,8 veces mayor para el grupo con administración de 4 mg/cuerpo (Composición 15) y aproximadamente de 141,7 veces mayor para el grupo con administración de 8 mg/cuerpo (Composición 16) en comparación con el grupo sin administración de adyuvante.

El grupo con administración de ácido L-ascórbico solo presentaba casi ningún efecto de producción de anticuerpos (en comparación con el Control 1 y la Composición 17). Sin embargo, el grupo con administración de ácido L-ascórbico y citrulina presentaba un aumento del efecto de producción de anticuerpo aproximadamente 4,0 veces mayor en comparación con el grupo de administración de citrulina sola (de la comparación de las Composiciones 13 y 18), aproximadamente de 12,1 veces mayor en comparación con el grupo con administración de ácido L-ascórbico solo (de la comparación de las Composiciones 17 y 18), aproximadamente de 39,4 veces mayor en comparación con el grupo con la administración de Aluminio (de la comparación del Control 2 y la Composición 18), y aproximadamente de 46,9 veces mayor en comparación con el grupo sin administración de citrulina (de la comparación del Control 1 y la Composición 18).

Tanto el grupo con administración de citrulina como el grupo con administración de citrulina y ácido ascórbico presentaban un mayor efecto de producción de anticuerpos que la del grupo con la administración de Aluminio, es decir, aproximadamente 9,8 veces mayor con la Composición 13, aproximadamente 35,5 veces mayor con la composición 14, aproximadamente 119 veces mayor con la Composición 16, y aproximadamente 39,4 veces mayor con la Composición 18, proporcionando de esta manera un efecto de producción de anticuerpos extremadamente excelente en comparación con el adyuvante de Aluminio convencional.

A partir de los resultados que se muestran en los Ejemplos 1, 2, 3 y 4, se observa evidentemente que la citrulina tenía un efecto adyuvante independientemente del tipo de antígeno. Para una concentración específica de citrulina, el efecto era equivalente a la del adyuvante de Aluminio convencional. En particular, en el caso de un antígeno peptídico, el efecto era mayor que el del adyuvante de Aluminio convencional. Además, se descubrió que la citrulina presenta un mayor efecto adyuvante cuando se utiliza en combinación con ácido ascórbico.

Además, la citrulina es altamente segura ya que ni las anomalías ni induraciones que se ven en el área tópica donde se administra el Aluminio se encontraron en los ratones a los que se administró citrulina.

**Aplicabilidad industrial**

La presente divulgación proporciona una composición adyuvante que comprende citrulina y una composición vacunal que comprende dicha composición adyuvante y un antígeno. Como la citrulina es útil para el cuerpo vivo y es una sustancia hidrosoluble, es posible proporcionar una composición adyuvante y una composición vacunal que son altamente seguras y excelentes en comodidad para la composición en comparación con el adyuvante de Aluminio convencional o los adyuvantes oleosos.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120> Una composición adyuvante que comprende citrulina

<130> 670771

<150> JP 2011-053658

<151> 11-03-2011

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Virus de gripe A

ES 2 731 636 T3

<400> 1

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
 1 5 10 15  
 Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
 20

5 <210> 2  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Un péptido modificado obtenido insertando cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la gripe

15 <400> 2

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
 1 5 10 15  
 Arg Cys Asn Cys Asp Cys Ser Cys Ser Asp  
 20 25

20 <210> 3  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
 20 25 30  
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
 35 40

25 <210> 4  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido sintetizado

35 <400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys  
 20 25

40 <210> 5  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido sintetizado

<400> 5

ES 2 731 636 T3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15  
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Cys  
20 25

<210> 6  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15  
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30  
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
35 40

10

## REIVINDICACIONES

1. Una vacuna para su uso en el aumento de la respuesta inmunológica contra un antígeno, donde la vacuna comprende el antígeno y un adyuvante, y donde el adyuvante comprende citrulinas que son el ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)-pentanoico, que tiene la fórmula química  $C_6H_{13}N_3O_3$ .  
5
2. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde dichas citrulinas están contenidas de 1 mg/ml a 50 mg/ml.
- 10 3. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que comprende adicionalmente un antioxidante.
4. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la relación de peso de dicho antígeno y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 100 o más.
- 15 5. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde dicho antígeno es un antígeno del virus de la gripe.
6. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 donde dicho antígeno del virus de la gripe es al menos uno o dos o más seleccionados de entre el grupo que consiste en hemaglutinina (HA), matriz 2 (M2), neuraminidasa (NA), matriz 1 (M1) y proteína nuclear (NP).  
20
7. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 donde la relación de peso de dicho antígeno del virus de la gripe y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 300 o más.
- 25 8. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde dicho antígeno es un péptido.
9. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 donde la relación de peso de dicho péptido y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 100 o más.  
30
10. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 donde dicho péptido es un péptido M2e, un péptido M2e con adición o inserción de una o varias cisteínas, o un péptido M2e con adición de un péptido que contiene cisteína.
- 35 11. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 donde dicho péptido es un péptido sintético preparado insertando un resto de cisteína en las posiciones entre N.º 20 y N.º 21, entre N.º 21 y N.º 22, y entre N.º 22 y N.º 23, respectivamente, contando desde el extremo N de un péptido M2e que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 40 12. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 donde la relación de peso de dicho péptido M2e y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 200 o más.
13. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 donde dicho péptido es un péptido amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ), un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de una parte del péptido amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ) o dichos péptidos con adición o inserción de una o varias cisteínas.  
45
14. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 donde dicho péptido es un péptido que consiste en 28 restos de aminoácido contando desde el extremo N de un péptido amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ), hasta el extremo C en el cual se añade un resto de cisteína.  
50
15. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14 donde la relación de peso de dicho péptido amiloide  $\beta$  y dichas citrulinas es de 1:N donde N es 100 o más.
16. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde dicho antígeno es un péptido que consiste en al menos una o dos o más secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.  
55
17. Las citrulinas para su uso como un adyuvante que se va a administrar junto con un antígeno y que aumentan la respuesta inmunológica contra el antígeno, donde las citrulinas son el ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)-pentanoico, que tiene la fórmula química  $C_6H_{13}N_3O_3$ .  
60
18. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o las citrulinas para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, donde dichas citrulinas son una o dos seleccionadas de entre el grupo que consiste en L-citrulina y D-citrulina.  
65

19. Las citrulinas para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 o 18 donde dichas citrulinas se añaden a una vacuna de 1 mg/ml a 50 mg/ml.

5 20. Las citrulinas para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 en el cual también se utiliza un antioxidante.

21. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, o las citrulinas para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde dicho antioxidante es el ácido ascórbico.

Fig.1

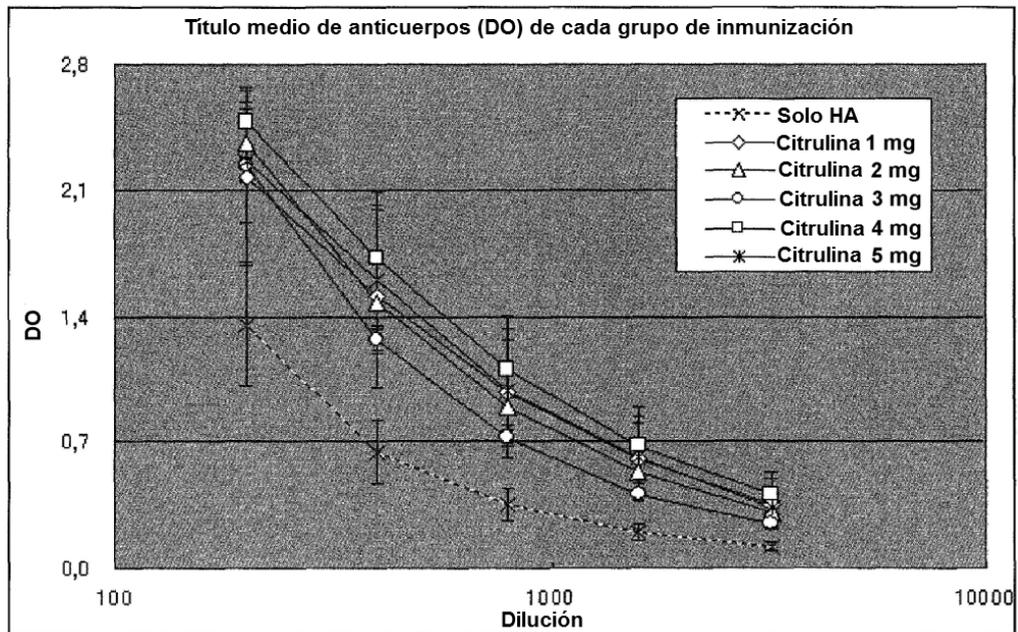


Fig.2

