



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 650**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

B05B 11/00 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99971718 .4**

86 Fecha de presentación : **08.11.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1126875**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2001**

54

Título: **Dispositivo de entrega para una composición de una sustancia farmacéuticamente activa.**

30

Prioridad: **06.11.1998 DE 198 51 282**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73

Titular/es: **Berna Biotech AG.**
Rehhagstrasse 79
3018 Bern, CH

72

Inventor/es: **Glück, Reinhard;**
Glück, Ulrich y
Collioud, André

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 279 650 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

Dispositivo de entrega para una composición de una sustancia farmacéuticamente activa.

5 La presente solicitud se refiere a composiciones de una sustancia farmacéuticamente activa, en especial antígenos, que están mezcladas con un adyuvante mucosal y que pueden aplicarse sobre la mucosa nasal mediante un dispositivo de entrega configurado como aplicador de spray (atomizador), de modo tal que puede obtenerse una eficacia no lograda hasta ahora.

10 En especial, la solicitud describe una vacuna para aplicación intranasal, consistente en:

(a) proteínas de superficie de influenza, que están formuladas con liposomas (virosoomas);

(b) adyuvante mucosal de procedencia bacteriana;

15 (c) aplicador específico de spray, que está construido de manera tal que casi el 100% del impacto del spray puede aplicarse por completo sobre la mucosa nasal, importante para la eficacia.

20 Los antígenos son preferentemente glicoproteínas de superficie de influenza, que están formuladas con liposomas (denominados virosomas). Estos virosomas se mezclan con un adyuvante mucosal, que es de procedencia bacteriana. Idealmente, proviene de la clase de las toxinas activas o inactivas, tales como HLT (*Heat Labile Toxin*, Toxina Térmicamente Inestable), coleratoxina (CT) o procoleragenoide (PCG). El aplicador nasal de spray está construido de manera tal que la sustancia activa puede aplicarse sustancialmente sin desperdicio sobre la mucosa nasal. La fórmula sobre la cual se basa la invención puede utilizarse para diversas indicaciones médicas, tales como vacunación contra

25 gripe u otras enfermedades infecciosas, así como para el tratamiento terapéutico de nariz obstruida, de restitución de mucosa nasal dañada o en términos generales de enfermedades localizadas en las mucosas.

Diversos autores han descrito la acción inmunoestimulante de los liposomas (membranas artificiales) (Gregoriadis, G.: Immunological adjuvants: A role for liposomes, *Immunol. Today* 11 (1990) 89-97). Esta acción inmunoestimulante se logra acoplando los antígenos sobre las superficies de los liposomas (Glück R, Mischler R, Finkel B, Que JU, Scarpa B, Cryz SJ Jr: Immunogenicity of new virosome influenza vaccine in the elderly people. *Lancet* 344 (1994) 160-163), encerrándolos en el interior de los liposomas (Gregoriadis G, Davis D, Davis A: Liposomes as immunological adjuvants: Antigen incorporation studies. *Vaccine* 5 (1987) 145-151) o mezclándolos con liposomas solamente (De Haan A, Geerligts HJ, Huckshorn JP, Van Scharrenburg GJM, Palache AM, Wilschut J: Mucosal Immunoadjuvant activity of liposomes: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with an influenza subunit vaccine and coadministered liposomes. *Vaccine* 13 (1995) 613-616). Se observó una acción inmunoestimulante adicional cuando se "clavaron" tales liposomas con glicoproteínas transmembranales y fusógenas (por ejemplo, glicoproteínas de influenza (Glück, R., Mischler, R., Brantschen, S., Just. M., Althaus, B., Cryz, S. J., Jr.: Immunopotentiating reconstituted influenza virosome (IRIV) vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. *J. Invest.* 90 (1992) 2491-2495), o sendaiglicoproteínas (Gould-Fogerite, S., Mazurkiewicz, J.E. Bhisitkui, D., Mannino, R.J.: The reconstitution of biologically active glycoproteins into large liposomes. Use as a delivery vehicle to animal cells. En: C.H. Kim, J. Diwan, H. Tedeschi y J. J. Salerno (Editores), *Advances in Membrane Biochemistry and Bioenergetics*, Plenum Publishing Corp., Nueva York (1987), página 569).

30

35

40

45 Sin embargo, hasta ahora se ha descrito esta acción por lo general después de aplicación parenteral (i.m., s.c. o i.p.). No obstante ello, algunos autores han descubierto que tales formulaciones pueden administrarse exitosamente con métodos convencionales (gotero o spray nasal convencional). Empero, los resultados se refieren casi exclusivamente a experimentos con animales de laboratorio, generalmente ratones, que en relación con su peso corporal poseen una mucosa nasal mucho mas grande en comparación con el ser humano. Además, la cantidad de antígeno administrada era tan elevada, que sólo por razones económicas como también de seguridad del producto no cabía considerar una aplicación en seres humanos. También pudo demostrarse que en caso de una dosificación razonable del antígeno (influenza), a pesar de una formulación liposomal y de una correcta aplicación nasal, no podía lograrse una acción satisfactoria.

50

55 Por ello otros autores intentaron desarrollar una vacuna aplicable nasalmente eficaz mediante la mezcla del antígeno con un adyuvante mucosal de origen bacteriano en lugar de la formulación liposomal. En este caso se utilizaron en especial HLT, CT o derivados no tóxicos de HLT o de CT (Elson CO, Ealding W: Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin, *J. Immunol.* 132 (1984) 2736-2741).

60 Los resultados en la bibliografía mostraban de hecho acciones muy prometedoras después de aplicación nasal, las cuales, nuevamente, se lograban especialmente en animales de laboratorio. Sin embargo, unos pocos ensayos clínicos en seres humanos confirmaron una determinada eficacia (Tamura S-J, Ishikira K, Miyata K, Aizawa C, Kurata T: Mechanism of enhancement of the immune responses to influenza vaccine with cholera toxin B subunit and a trace amount of holotoxin. *Vaccine* 13 (1995) 339-341). Pero nuevamente, las cantidades de antígeno y de adyuvante a utilizarse eran muy elevadas, lo cual a su vez dejaba pendiente reservas en cuanto a la seguridad del producto y la posibilidad de su comercialización.

65

ES 2 279 650 T3

Otras desventajas de los experimentos descritos hasta aquí para el desarrollo de una vacuna aplicable por vía nasal, eficaz desde el punto de vista preventivo o terapéutico, son los sistemas aplicadores insuficientes actualmente disponibles.

5 En la actualidad existen sprays nasales como aplicadores de una sola dosis, de dos dosis o de múltiples dosis. Las investigaciones y exámenes exhaustivos de los sprays nasales de hasta ahora mediante aplicación de colorantes (azul de metileno) y endoscopia nasal han dado como resultado que a lo sumo el 25% de la sustancia a atomizarse (vacuna, solución farmacéutica) llega a la membrana mucosa del sistema inmunológico, asociado con la mucosa, de los turbinales.

10 La mucosa del sistema inmunológico asociada con la mucosa se encuentra en la fosa nasal en el tabique lateral de la nariz en la zona de los turbinales (conchas nasales), como se muestra por ejemplo en la Figura 1, que representa los turbinales humanos y los turbinales de un corzo. Nuestras investigaciones han dado como resultado que con los sprays nasales de hasta ahora, debido a considerables pérdidas en el vestíbulo nasal (véase la Figura 2), como también en el
15 tabique nasal, solamente llega una cantidad insuficiente de la sustancia farmacéuticamente activa a las fosas principales de la nariz. Estas estructuras nasales están revestidas de epitelio de placa y de glándulas sebáceas, inmunológicamente inactivas (Walter Becker, Hans Heinz Naumann, Carl Rudolf Pfaltz: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York 1992).

20 El documento US 5.797.390 divulga un aplicador de spray nasal con una parte removible. La parte removible está dimensionada y conformada de manera tal que calza exactamente en las ventanas nasales (de un ser humano o de un animal); en este caso, un extremo proximal de la parte removible se extiende preferentemente hacia fuera, a efectos de impedir que el usuario introduzca la pieza removible a una profundidad excesiva en el orificio nasal.

25 El documento FR 2 739 294 describe un dispositivo de entrega con un manguito. Sin embargo, el manguito tiene por finalidad limitar intencionalmente la longitud de la sección del dispositivo de entrega que penetra en el orificio nasal, a efectos de prevenir una lesión de la mucosa nasal por el dispositivo de entrega.

30 El documento US 2.434.875 divulga un dispositivo de atomización para la administración nasal de medicamentos, para lo cual se atomiza una cantidad medida de medicamento en forma de un delgado chorro, usualmente en forma de aguja, en el conducto nasal.

35 El documento EP-A-0 170 198 describe un dispensador para la aplicación intranasal de soluciones de sustancias activas, que está conformado de modo tal que el usuario inclina necesariamente la cabeza hacia atrás y de esta manera adopta la posición de la cabeza deseada desde el punto de vista médico.

40 El documento WO 98/57690 divulga un aplicador de spray nasal, que contiene un manguito, que al ser accionado se introduce por lo menos en parte en un orificio nasal. El aplicador de spray nasal puede también presentar una pieza de unión que puede insertarse en el aplicador de spray nasal en una orientación definida, así como un dispositivo de apoyo, que garantiza una orientación controlada del aplicador durante la utilización.

Las causas de la incapacidad de los aplicadores nasales de hasta ahora de atomizar una dosis suficiente sobre la membrana mucosa respiratoria (lugar de defensa específico y no específico), son de diversos tipos:

45 (1) a causa de insuficientes conocimientos anatómicos, el vector principal del chorro de atomización se orienta en una dirección errónea durante la aplicación del spray. Con ello la sustancia farmacéuticamente activa llega apenas a la cavidad principal de la nariz. El líquido atomizado fluye en parte sobre el labio superior hacia abajo.

50 (2) el diámetro del inserto de atomización junto a la parte de nariz no está adaptado a las circunstancias anatómicas. El orificio nasal interno tiene por naturaleza una forma de hendidura y tiene la función de una boquilla (véase la Figura 2). Las piezas nasales, usualmente anchas, no están en condiciones de superar este estrecho anatómico. Durante la atomización en la luz de la nariz (lumen nasi) llega a las cavidades principales de la nariz solamente aquel sector del cono de atomización que corresponde al ancho de la luz de la nariz.

55 (3) hasta ahora, el ángulo de atomización óptimo no se ha sondeado de manera científica. En el caso de los aplicadores de spray convencionales, el mismo varía arbitrariamente entre 30° y 80° con respecto a la horizontal en caso de mantenerse la cabeza en posición normal, o con respecto a una normal al eje longitudinal del cuerpo de un ser humano. Con esto se explican también las considerables pérdidas, a saber de hasta 90% del volumen aplicado. Nuestras investigaciones sistemáticas han demostrado que el ángulo de atomización óptimo está entre 50 y 80°C.

60 (4) los sprays nasales convencionales tienen una pieza nasal demasiado corta. La distancia del manguito para los dedos hasta la abertura de atomización es demasiado corta. Con los sprays de hasta ahora no se llega ni siquiera al interior del orificio de la nariz. La pieza nasal debería tener por lo menos 0,7 cm de longitud adicional; en especial, se prefiere especialmente que la pieza nasal presente una longitud de 1 a 1,5 cm.

65 Por ello, la presente invención tiene la misión poner a disposición un dispositivo de entrega mejorado, así como un manguito con un dispositivo de unión para su disposición en el dispositivo de entrega, en especial para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas. Esta misión se logra gracias a las características de reivindicaciones.

ES 2 279 650 T3

La composición más eficaz para la acción preventiva y terapéutica consiste en la fórmula con el efecto, sorprendentemente coestimulante, de liposomas mezclados con un adyuvante mucosal y aplicado con un nuevo dispositivo de entrega, o con un nuevo spray nasal.

5 Por consiguiente, el complejo de la invención consiste en los componentes siguientes:

(a) una sustancia activa (antígeno);

(b) una mezcla ponderada de liposomas y de adyuvante mucosal; y

10

(c) un nuevo aparato médico, a saber un dispositivo de entrega específico o spray nasal.

En especial, se describen vacunas para la aplicación intranasal, consistentes en:

15

(a) proteínas de superficie de influenza, que están formuladas con liposomas (virosoomas);

(b) adyuvante mucosal de origen bacteriano; y

20

(c) aplicador específico de spray, que está diseñado de manera tal que casi el 100% del impacto de spray puede aplicarse sin desperdicio sobre la mucosa nasal, importante para la eficacia.

Por ello, la sustancia activa se refiere a antígenos, en especial a glicoproteínas de influenza, las cuales, debido a sus dominios transmembranales, pueden incorporarse fácilmente en membranas artificiales (liposomas). Sin embargo, es también fácil acoplar otros antígenos, solos o en combinación, con los antígenos de influenza sobre la superficie de los liposomas. El acoplamiento tiene lugar en función de la naturaleza química de los antígenos, de manera espontánea o mediante una molécula química de reticulación, como ya se había descrito con anterioridad (Martin FJ, Papahadjopoulos D: Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles, J. Biol. Chem. 257 (1982) 286-288). También puede tratarse de un SDN-plásmido o de un SRN -plásmido, que codifica un antígeno y que puede incluirse en los liposomas.

En el sentido de la presente invención, el término "antígeno" abarca tanto moléculas completas como también fragmentos de estas moléculas, que tienen propiedades antigénicas y/o que pueden emplearse para la inmunización. Además, el término "antígeno" abarca moléculas y/o fragmentos de moléculas, que son inmunoestimulantes.

35

La proteína de superficie de influenza empleada en la vacuna conforme a la invención abarca preferentemente hemaglutinina (HA). Además, la proteína de superficie de influenza puede abarcar hemaglutinina (HA) en compuesto/combinación con neuraminidasa (NA).

40 En una forma de realización especial, la invención se refiere a una vacuna que contiene otros antígenos. En especial, los otros antígenos pueden estar unidos a la superficie de los virosoomas.

En otra forma de realización preferida, la solicitud se refiere a vacunas conformes a la invención, que además del antígeno consistente en proteína(s) de superficie de influenza contienen otros antígenos, preferentemente de organismos patógenos. En este caso, el organismo patógeno puede ser un virus, una bacteria, un hongo o un parásito. Estos organismos abarcan diversos agentes patógenos como, por ejemplo, virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, virus sincitial respiratorio (neumovirus), virus de parainfluenza, virus de paperas, morbillivirus, VIH, bacteria de difteria (*Corynebacterium diphtheriae*), bacilo de tétanos (*Costridium tetani*), neumococos, *Haemophilus influenzae*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, especies de *Aspergillus*, especies de *Tricomonas*, especies de *Tripanosoma*, especies de *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, especies de trematodos y especies de nematodos. En especial, las especies de trematodos abarcan *Schistoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum* y las especies de nematodos *Tricharis trichiura*, *Ascaris lumbricoides* y *Trichinella spiralis*.

55 Por otra parte, la invención abarca una vacuna que es una vacuna contra influenza. En especial, la invención abarca una vacuna, que puede utilizarse para la prevención y/o tratamiento de infecciones/enfermedades infecciosas generales. Además, la vacuna sirve para la prevención y/o tratamiento de enfermedades de influenza, para la prevención y tratamiento de nariz taponada, para el tratamiento de lesiones de mucosas de nariz. Además, la invención abarca preferentemente vacunas, caso éste en el que el contenido en hemaglutinina por dosis (100 µg) se halla entre 1-30 µg, con ventaja entre 3-10 µg y mejor aún, es de aproximadamente 3,75 µg.

60 En una forma de realización preferida la invención muestra una vacuna, en la que la relación entre liposomas-fosfolípido y HA se encuentra entre 1:10 y 20:1, preferentemente entre 1:1 y 10:1, y que de manera especialmente preferida, es de 3:1.

65

Además de ello, la invención se refiere preferentemente a una vacuna en la que el fosfolípido de los liposomas ha sido elegido del grupo de los fosfolípidos neutros, catiónicos y/o aniónicos.

ES 2 279 650 T3

En una forma de realización preferida, la invención se refiere a una vacuna en la que el adyuvante mucosal es una toxina activa, una toxina inactiva y/o una toxina no tóxica. En especial, el adyuvante mucosal abarca preferentemente HTL (*Heat Labile Toxin*, Toxina Térmicamente Inestable), coleratoxina (CT) y/o procoleragenoide (PCG). En otra forma de realización preferida, el adyuvante mucosal es la toxina térmicamente Inestable (HLT) de *Escherichia coli*.
5 En otra forma de realización preferida, las toxinas pueden estar desactivadas. Esta desactivación puede tener lugar mediante tecnología de recombinación.

En otra forma de realización, la invención abarca una vacuna, que contiene HLT (*Heat Labile Toxin*) y/o CT (coleratoxina) en una relación que se encuentra entre 1:2 a 20:1, mejor entre 1:1 y 1:10, y que en especial es de 7,5:1.

La expresión arriba utilizada “mezcla ponderada de liposomas y adyuvante mucosal” se refiere por una parte a la relación correcta entre antígeno y fosfolípidos así como adyuvante mucosal, que es necesaria para una eficacia satisfactoria. Las investigaciones clínicas han demostrado lo siguiente: la relación ideal entre fosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfolípidos neutros, aniónicos o catiónicos) y antígeno de influenza, se halla
10 entre 1:1 y 20:1. El valor ideal es de 3:1. La relación entre antígeno de influenza y adyuvante mucosal activo (toxina) HLT o CT, se encuentra entre 1:2 y 20:1. La relación más ventajosa es de 7,5:1.

Como se mencionó arriba, la relación entre antígeno de influenza y adyuvante mucosal inactivo (toxina inactiva) PCG o derivado no tóxico de HLT y CT, se encuentra entre 3:1 y 1:20, e idealmente tiene un valor 1:2.

Los experimentos *in-vitro* para la medición de la acción inmunoestimulante sobre la mucosa han demostrado sorpresivamente que una mezcla de los adyuvantes liposomas y adyuvante mucosal no causa una adición de las acciones, sino que la adición se eleva en un factor por lo menos igual a cinco.

La expresión “nuevo aparato médico” se refiere a un aplicador de spray que es especialmente adecuado para la inmunización (vacunación) intranasal. No basta con componer una sustancia que sea mucosalmente eficaz, si su aplicación es mala o insuficiente.

El nuevo aparato se destaca porque tiene en cuenta por completo las características anatómicas de la nariz:

(1) la distancia entre los manguitos para los dedos hasta el cabezal de atomización es preferentemente de por lo menos 4,0 cm;

(2) la parte anterior de la pieza para nariz consiste en un inserto adicional esencialmente cilíndrico, que tiene por ejemplo una longitud mínima de 5 mm y un diámetro de a lo sumo 5 mm;

(3) el ángulo de atomización del dispositivo de entrega descrito en esta invención, es preferentemente de 50 a 70° con respecto a la horizontal;

(4) el eje de la dirección principal del dispositivo de entrega, o del aplicador de atomización, se determina preferentemente mediante un manguito especial: el manguito puede insertarse preferentemente sobre la parte anterior de la pieza para la nariz del dispositivo de entrega, y está configurado de manera tal que durante la aplicación nasal de atomización puede apoyarse sobre el labio superior, de modo tal que la dirección de la atomización apunta esencialmente hacia la pared lateral de la fosa nasal.

Se prefiere una configuración del manguito para apoyar sobre el labio superior, por cuanto el labio superior se encuentra relativamente cerca de la nariz, a pesar de lo cual la distancia es suficientemente grande para formar una palanca eficaz para una orientación ventajosa. Además, los sensores táctiles sensibles de los labios permiten que el usuario verifique el apoyo correcto (céntrico o paralelo) del manguito, sin echar un vistazo en un espejo. Además, también es posible configurar el manguito para su apoyo en otras partes del cuerpo o de la cabeza.

La pieza de nariz esbelta tiene preferentemente una longitud mínima de 0,5 cm, mejor de 1 cm, y la pieza de nariz subsiguiente, más gruesa, tiene preferentemente una longitud de 1 cm, ventajosamente de 2 cm. La distancia entre la superficie dorsal de los dedos y la punta de spray debería como mínimo de 2 cm, ventajosamente de 2,5 a 3 cm, o la distancia entre el descanso para los dedos (manguito) hasta la punta del atomizador debería ser de por lo menos 3 cm, ventajosamente de 4 a 5 cm. El ángulo de atomización del spray debería ser preferentemente de 50 a 70° con respecto a la horizontal, cuando se mantenga la cabeza en una posición vertical normal.

Además, el vector principal del impacto de atomización debería estar orientado entre la concha nasal media e inferior, es decir, debería estar orientado hacia el conducto medio de la nariz. Esto presupone una orientación casi horizontal del aplicador. Tal como se describe en la presente invención, esta orientación puede fijarse mediante la colocación de un manguito especial del aplicador. También es posible configurar el manguito y el aplicador de una sola pieza o solidarios entre sí. En este caso, el dispositivo de fijación/dispositivo de unión está vinculado solidariamente al aplicador, o ha sido realizado de una sola pieza con el mismo.

En una forma de realización preferida, en el caso del aplicador de atomización, se trata de un aparato cuya pieza de nariz con cabezal atomizador tiene un espesor de a lo sumo 5 mm y una longitud mínima de 5 mm, preferentemente de 7 mm, cuya distancia entre el manguito para los dedos y la punta del cabezal de atomización es de por lo menos 3

ES 2 279 650 T3

cm y que mediante un manguito montable permite la introducción en la fosa nasal de manera tal que el sector principal del spray nasal forma un ángulo de aproximadamente 15 a 20° con la horizontal.

5 En otra forma de realización preferida, el antígeno es una mezcla de antígenos de superficie de influenza, que se presenta en la superficie de liposomas. Este agente puede combinarse con antígenos de otros microorganismos patógenos. Por ello, y tal como se mencionó arriba, las vacunas conformes a la invención pueden contener otros antígenos, preferentemente antígenos de otros organismos patógenos.

10 En otra forma de realización, el procedimiento antes descrito sirve para la profilaxis de enfermedades infecciosas, para el tratamiento de una nariz taponada y de diversos trastornos de la mucosa nasal.

A continuación se describen formas de realización preferidas de la invención, haciéndose referencia a los dibujos a título de ejemplo. En los dibujos:

15 la Figura 1 muestra una representación comparativa entre turbinas humanas y los turbinas de un corzo;

la Figura 2 es una representación esquemática de la estructura anatómica de un orificio nasal interior;

20 la Figura 3 es una representación esquemática de la estructura fundamental de una forma de realización preferida del dispositivo de entrega conforme a la invención;

la Figura 4 es una representación del ángulo de atomización correcto en el caso de una aplicación eficaz;

25 la Figura 5 es una representación de una citología nasal: cuantificación de las diversas poblaciones celulares, que se obtuvieron mediante técnica de frotis nasal de los individuos (20 de cada grupo) hasta 29 días después de tres tipos diferentes de vacuna intranasal. Obsérvese el manifiesto incremento de los centroblastos como síntomas de una inmunorespuesta local en el grupo A en contraste con un incremento, manifiestamente menor, en los grupos B y C ($p < 0,005$);

30 la Figura 6 representa una forma de realización preferida del dispositivo de entrega conforme a la invención sin manguito; y

las Figuras 7a y 7b son dos vistas de una forma de realización preferida de un manguito para el dispositivo de entrega conforme a la invención de la Figura 6.

35 Ejemplo 1

Producción de una vacuna virosomal mucosal contra el virus de influenza, con HLT como adyuvante mucosal adicional

40 La producción de una vacuna virosómica contra influenza ha sido descrita por Glück R, Wegmann A: Liposomal presentation of influenza antigens. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editores, Textbook of Influenza (1998) páginas 400-409. Londres. Blackwell. En breve, la producción abarca: las cepas H1N1 A/Singapur/6/86, H3N2 A/Wuhan/359/95 y B/Beijing/184/93 del virus de influenza, que se cultivaron en huevos de gallina empollados, fueron provistas por el National Institute of Biological Standards and Control, Londres, GB. Se aislaron viriones intactos del líquido de la corioalantosis por centrifugación de zonas, y se los inactivó mediante β -propiolactona. Se introdujeron viriones depurados en un tampón que contenía OEG (octaetilenglicolmono(N-dodecil)éter (Nikko Chemicals, Japón) 0,1 M en PBS-NaCl. Los mismos se incubaron durante 20 minutos a 21°C, a efectos de posibilitar la descomposición completa de los componentes de virus.

50 Para la extracción de hemaglutinina (HA) y de neuraminidasa (NA) se centrifugó la mezcla durante 60 minutos a 100.000xg. El sobrenadante, que contenía HA, NA y fosfolípidos (PL) virales, se utilizó para la producción de las diversas formulaciones de vacuna intranasales. Se añadieron fosfolípidos adicionales (fosfatidilcolina [lipoide, Alemania], y se los solubilizó. Los virosomas se formaron espontáneamente durante la separación del OEG-detergente mediante cromatografía. A una dosis de vacuna mucosal (100 μ l), que contenía 3,75 μ g de HA de cada una de las tres cepas de virus de influenza, tal como recomienda la OMS, y 35 μ g de lecitina, se añadieron 0,5 μ g de HLT (*Heat Labile Toxin*, Toxina Térmicamente Inestable) de *E. coli* de la cepa de producción *E. coli* HE22VK (Vogel FR, Powell MF: A compendium of vaccine adjuvants and excipients. En: Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (M.F. Powell, M.J. Newmann, editores), Plenum Press, Nueva York (1995), página 141) en calidad de adyuvante mucosal.

60 Ejemplo 2

Las células de *E.coli* se sedimentan en una centrífuga continua (Westfalia AG) y se suspenden en PBS (Phosphate buffered saline, solución salina tamponada con fosfato, 6,06 g/L Na₂HPO₄, 1,46 g/L KH₂PO₄, 2,4 g/L NaCl pH 7,4).

La liberación de la toxina intracelular inestable al calor (HLT) tiene lugar mediante desintegración celular en un molino de bolas (por ejemplo, Dyna-Mill, W. Bachofen AG) o en una prensa French. Por ejemplo: una suspensión de

ES 2 279 650 T3

células de 10 L se bombea con un caudal de 33 mL/min a través del molino de bolas. El molino de bolas se llena con 500 mL de bolillas de vidrio, se hace rotar a 3.000 rpm, y la abertura de ranura es de 0,05 mm.

5 La separación de los componentes sólidos de las células desintegradas tiene lugar mediante microfiltración tangencial. Por ejemplo: el lisado de 10 L de células se reúne en un sistema Prostack (Millipore AG) bajo utilización de un filtro cuyos poros tienen un tamaño de 0,2 μ , hasta completar aproximadamente 4 L. Seguidamente se efectúa un lavado final con 24 L de PBS. El permeado se filtra a través de un filtro estéril de 0,2 μ (por ejemplo, Gelman Supor DCF, Pall). Del filtrado se aísla la HLT mediante cromatografía de afinidad. Como fase estacionaria se utiliza galactosa inmovilizada (Galactosa-gel, por ejemplo, de Pierce) o lactosa inmovilizada (lactosil-gel, por ejemplo de Pharmacia).
10 La fase móvil consiste en PBS (tampón A) y 5% (g/v) de lactosa en PBS semiconcentrada (tampón B). Por ejemplo: el lisado de células, filtrado estérilmente, se aplica sobre la columna preacondicionada con tampón A, y la columna se enjuaga seguidamente con tampón A, hasta que la absorción de UV a 280 nm llega a la línea de base. A continuación se separa la HLT de la columna por elución con tampón B.

15 Ejemplo 3

Preparación de una vacuna mucosal virosomal contra la influenza con PCG como adyuvante mucosal adicional

20 La producción de una vacuna virosomal contra la influenza está descrita en el Ejemplo 1. A una dosis de vacuna mucosal (100 μ l), que contenía 3,75 μ g de HA de cada una de tres cepas de vacunas de influenza, tal como recomienda la OMS, y 35 μ g de lecitina, se añadieron 6 μ g de procoleragenoide, producido mediante calentamiento de CT purificada, que provenía de *V. cholerae* (Inaba 569B), a título de adyuvante mucosal (Pierce NF, Cray WC, Sacci JB, Craig JP, Germanier R, Furer E: Procoleragenoide: A safe and effective antigen for oral immunization against experimental cholera. *Inf. Immunity* **40**, 3 (1983) 1112-1118).

25 Ejemplo 4

Preparación de una vacuna mucosal contra Hepatitis B (HBs)

30 Se disolvió fosfatidiletanolamina (R. Berchtold, Biochemisches Labor, Berna, Suiza) en metanol, y se añadió trietilamina al 0,1% (vol/vol). La solución se mezcló seguidamente con N-hidroxisuccinimida éster de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS, γ -Maleimidobuttersaure-N-hydroxysuccinidester) (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) (relación fosfatidiletanolamina: GMBS = 2:1), que había sido disuelto anteriormente en DMSO (dimetilsulfóxido). Después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente se evaporaron los disolventes durante una hora
35 bajo vacío en una centrifuga Speedvac. Las partículas de HBs recombinantes se prepararon en cepas de células HLO siguiendo procedimientos conocidos, y se purificaron.

A efectos de obtener partículas de HBs reducidas con restos de cisteína libres, se trataron las partículas con 40 mMol/l de DTT (DL-ditiotreitol) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La DTT se separó mediante utilización de una columna Sephadex-G10 (Pharmacia LKB Technology, Uppsala, Suecia), y se adicionó octaetilenglicol (OEG, Fluka Chemicals, Suiza) con una concentración final de 100 mMol/l. Seguidamente se mezcló la fosfatidiletanolamina-GMBS evaporada con la solución de HBs durante una hora (Relación HBs: GMBS = 1:2), y el GMBS no ligado se capturó mediante cisteína. Las reacciones se supervisaron mediante cromatografía de capa delgada.

45 32 mg de fosfatidilcolina (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemania) y 6 mg de fosfatidiletanolamina se añadieron a la fosfatidiletanolamina-GMBS-HBS anteriormente reticulada, y se disolvió esta mezcla en un volumen total de 2,66 ml de PBS, que contenía 100 mM de OEG (PBS-OEG).

50 Se purificó la hemaglutinina de influenza A/Singapur, como anteriormente descrito en el Ejemplo (1). Se centrifugó durante 30 minutos a 100.000 g una solución que contenía 4 mg de hemaglutinina, y el sedimento se disolvió en 1,33 ml de PBS-OEG.

55 Los fosfolípidos y la solución de hemaglutinina se mezclaron y se trataron durante 1 minuto con ultrasonido. La mezcla se centrifugó entonces a 100.000 g, y el sobrenadante se filtró estérilmente (0,22 μ m).

Seguidamente se separaron virosomas con HBs adsorbido mediante separación del detergente con utilización de pellas BioRad-SM-Bio-Beads de acuerdo con el Ejemplo 1. Se añadió una solución madre que contenía 50 μ g de HBs-antígeno/ml con 10 μ g/ml del Ejemplo 2, y se trasegó en aplicadores de atomización de acuerdo con el Ejemplo 6.

60 Ejemplo 5

Ensayo in-vitro para ensayar la actividad del adyuvante mucosal

65 Las actividades biológicas de los adyuvantes mucosales se midieron con virosomas de influenza, HLT, PCG, una mezcla de virosomas y HLT conforme al Ejemplo 1 y una mezcla de virosomas y PCG conforme al Ejemplo (2). Las siguientes soluciones fueron añadidas a células de cápsulas suprarrenales Y-1 según ATCC: CCL 79 (tumor adrenal Y-1, mouse steroid secreting) en minicultivo según Sack DA y Sack RB (Sack DA y Sack RB: Test for enterotoxigenic *Escherichia* using Y-1-adrenal cells in miniculture. *Infect. Immun.* **11** (1974) 334-336):

ES 2 279 650 T3

(a) HLT (5 $\mu\text{g/ml}$), (b) PCG (60 $\mu\text{g/ml}$), (c) virosomas de influenza y HLT: 37 $\mu\text{g/ml}$ hemaglutinina de influenza de en cada caso 3 cepas (H1N1, H3N2, B), 100 $\mu\text{g/ml}$ de fosfatidilcolina y 5 $\mu\text{g/ml}$, así como (d) virosomas de influenza y PCG 37 $\mu\text{g/ml}$ de hemaglutinina de influenza en cada caso de 3 cepas, 100 $\mu\text{g/ml}$ de fosfatidilcolina y 60 $\mu\text{g/ml}$ de PCG.

5

Se determinaron las siguientes actividades de los adyuvantes (en unidades):

(a) 15 unidades, (b) 6 unidades, (c) 80 unidades, (d) 36 unidades. La máxima actividad biológica de adyuvante se llevó a cabo con la mezcla de virosoma y HLT o de virosomas y PCG. La acción de los adyuvantes se determinó mediante parámetros de toxicidad celular.

10

Ejemplo 6

Evaluación clínica de diversos aplicadores de spray

15

En su estructura básica, el dispositivo de entrega conforme a la invención es esencialmente comparable con aplicadores de spray convencionales, pero se adapta de manera especialmente buena a las circunstancias anatómicas para una aplicación nasal de una sustancia farmacéuticamente activa arbitraria, pero en especial de la descrita en la presente.

20

En las Figuras 3 y 6 se muestra una forma de realización preferida del dispositivo de entrega conforme a la invención. En la vista lateral, representada en la Figura 3, del dispositivo de entrega conforme a la invención (aplicador de spray) son reconocibles los componentes esenciales. El dispositivo de entrega 2 presenta esencialmente un contenedor 4 con una sustancia farmacéuticamente activa (no representada) y un mecanismo de atomización o de bombeo, 6. El mecanismo de bomba 6 está unido de manera hermética a los fluidos con el recipiente 4, por medio de un tramo o sección de unión 8. El bombeo y la atomización con el dispositivo de entrega conforme a la invención, 2, tiene lugar de manera convencional mediante el accionamiento de un manguito para los dedos, 10. La sustancia farmacéuticamente activa que se encuentra en el recipiente 4, se entrega por medio de una abertura 12 que se extiende a través del mecanismo de bombeo 12, en una abertura de salida, 14.

25

El dispositivo de entrega conforme a la invención, 2, se diferencia de los aplicadores de spray conocidos, en especial debido a la configuración constructiva de la pieza nasal 16, que desempeña un rol esencial en la aplicación efectiva de la sustancia farmacéuticamente activa. La pieza nasal, 16, está preferiblemente configurada de manera integral junto con el mecanismo de bomba, 8, y con el manguito para los dedos, 10. La pieza nasal 16 está preferentemente subdividida en dos tramos o secciones, 18 y 20, presentando la sección 18 dispuesta en la dirección del manguito para los dedos, 10, un diámetro mayor que el del tramo 20 de la pieza nasal 16 dispuesta en la proximidad de la apertura de salida 14. La zona de transición entre ambas secciones, 16 y 20, configura un tope, 22, para - de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención - un manguito 24, que puede ser fijada en la sección 20 de la pieza nasal 16, para su apoyo sobre el labio superior de un usuario.

30

La sección 20 situada en la proximidad de la apertura de salida 14, en la pieza nasal 16, está preferentemente configurada en forma de cilindro, y presenta un diámetro d_{20} máximo de 5 mm, preferiblemente entre aproximadamente 2 y 4 mm. La longitud, l_{20} , de la sección anterior 20 de la pieza nasal 16 es por ejemplo, de por lo menos 5 mm, preferiblemente de por lo menos 10 mm, y de manera especialmente preferida, de 10 a 20 mm. El manguito 24 puede deslizarse sobre la sección 20 de la pieza nasal 16, preferentemente desde la apertura de salida 14, y es preferible que se mantenga sobre el dispositivo de entrega 2 fijo contra la rotación gracias a un seguro contra la rotación. El seguro contra la rotación puede estar realizado por ejemplo en forma de un perfil poligonal, por ejemplo, con sección transversal elíptica, en la sección anterior 20 de la pieza nasal 16 y con un correspondiente recorte 26 en el manguito 24.

35

De manera correspondiente a otra forma de realización de dispositivo de entrega 2 conforme a la invención, la sección del aplicador de spray que penetra en la nariz de un paciente, también puede estar configurada en el manguito 24. En la Figura 7b se ha representado a título de ejemplo una forma de realización de este tipo. Tal como se muestra en la Figura 7b, en el manguito 24 se ha configurado un tope 28 de forma esencialmente tubular, que puede montarse sobre la sección 20 de la pieza nasal 16 situada en la proximidad de la apertura de salida 14. En este caso, las dimensiones de la sección tubular 28 corresponden preferentemente a las dimensiones (d_{20} y l_{20}) de la forma de realización anteriormente descrita.

40

45

La sección 18 de la pieza nasal 16 presenta preferentemente una longitud l_{18} de por lo menos 10 mm y preferentemente de aproximadamente 20 mm. Las dimensiones de ambas secciones, 18 y 20, se eligen preferentemente de manera que la distancia entre la superficie dorsal de los dedos de usuario y la punta del spray, o la apertura de salida, 14, es de por lo menos 2 cm, pero de manera ventajosa de 2,5 a 3 cm. Esto se garantiza en especial cuando la distancia entre el manguito 24 hasta la punta del spray, 14, es de por lo menos 3 cm, o de manera ventajosa, de 4 a 5 cm.

50

Gracias al dispositivo de entrega 2 conforme a la invención, con estas dimensiones es posible atomizar la sustancia farmacéuticamente activa con una puntería esencialmente mejor en la cavidad principal de la nariz, o en la fosa nasal interior de la nariz, de modo tal que puede lograrse una eficacia considerablemente más elevada que con sistemas conocidos.

55

ES 2 279 650 T3

El dispositivo de entrega 2 conforme a la invención está preferentemente previsto con el manguito 24 de modo que además de las dimensiones más favorables, es posible ajustar un ángulo de atomización α óptimo. Sin embargo, el manguito 24, independientemente del aplicado de spray 2 anteriormente descrito, también puede ser provisto en dispositivos de entrega convencionales de modo que también con estos aplicadores de spray tradicionales es posible lograr una eficacia considerablemente mejorada gracias al ángulo de atomización α ajustable con exactitud.

Por lo tanto, el dispositivo de entrega 2 conforme a la invención puede lograr la eficacia mejorada sea mediante la elección de las dimensiones de la pieza nasal 16 sea mediante un manguito 24 adecuado para el ajuste de un ángulo α de atomización óptimo. Sin embargo, se prefiere una combinación del novedoso dispositivo de entrega 2 con las dimensiones anteriormente descritas y con el manguito 24 para el ajuste de un ángulo de atomización α óptimo, a efectos de lograr los mejores resultados de tratamiento posibles.

Tal como se explicó brevemente en lo que precede, el manguito se desliza con la sección tubular 28 sobre la sección 20 de la pieza nasal 16. En estado montado, el manguito 24 se encuentra unido al dispositivo de entrega 2, preferentemente bloqueado contra rotación. A título de ejemplo, el seguro contra la rotación puede consistir en un perfil circular en la pieza nasal 16, aplanado en por lo menos un lado, con el cual es posible montar, de manera de impedir su rotación, el manguito 24 mediante una abertura correspondientemente formada. El manguito 24 presenta una sección de apoyo 30, que puede aplicarse sobre el labio superior de un usuario, para, junto con la sección 20 de la pieza nasal 16 orientada hacia el orificio nasal de un paciente, definir y fijar el ángulo de atomización α . El ángulo de atomización α óptimo se encuentra preferentemente entre 50° y 70°.

La sección de apoyo 30 del manguito 24 presenta preferentemente una ligera curvatura en correspondencia a la forma del labio superior, a efectos de poner a disposición una superficie óptima de contacto y de apoyo. El manguito 24 puede producirse de cualquier material adecuado, pero se prefieren materiales sintéticos colables por inyección.

Para la evaluación de la eficacia se ensayaron diversos dispositivos de entrega. A tal efecto se introdujo una solución de azul de metileno al 1% en cinco tipos distintos de aplicadores nasales:

(a) un aplicador de spray de acuerdo con esta invención, con manguito direccional, que fija la dirección del impacto de la atomización;

(b) un aplicador de spray, de acuerdo con esta invención, sin manguito direccional;

(c) un aplicador de spray convencional comercial, sin pieza nasal estrecha, de 2 cm de longitud y 4 mm de diámetro con un ángulo de atomización de 50°;

(d) un aplicador de spray conforme a esta invención, pero con un ángulo de atomización de 50°; y finalmente

(e) un aplicador de spray conforme a esta invención, pero con manguitos para los dedos, que solamente estaban separadas 3 cm del cabezal del atomizador.

La totalidad de los aplicadores de spray eran de los denominados aplicadores bidosis. Cada aplicador de spray fue probado en cada caso por cinco personas de ensayo bajo supervisión médica. Cada una de las personas que participaron en el ensayo atomizó una dosis de solución de azul de metileno en sus propios fosas nasales derecha e izquierda. Mediante endoscopia nasal se iluminaron los turbinales de la mucosa y se fijaron fotográficamente. La intensidad de la coloración azul así como las áreas teñidas de azul de los turbinales se evaluó en una escala de 1 a 4. La evaluación arrojó el siguiente resultado (medias geométricas):

Grupo (a): 19 puntos; grupo (b): 16 puntos; grupo (c): 7 puntos; grupo (d): 9 puntos; grupo (e): 12 puntos.

Solamente en el grupo (a) se aplicó el líquido de spray casi exclusivamente sobre la mucosa nasal. También en el grupo (b) una mayor parte del contenido de spray se atomizó sobre la mucosa. En los demás grupos se atomizó una proporción importante del contenido de spray en el vestíbulo nasal. Allí, el líquido de spray a aplicarse no puede ejercer ninguna eficacia.

Ejemplo 7

Comparación de la eficacia clínica de vacunas intranasales virosomáticas contra influenza con y sin HLT, utilizadas en un nuevo aparato de spray, que se describe en la presente invención, en voluntarios humanos, comparado con una vacuna parenteral comercial contra influenza.

Los estudios clínicos abiertos aleatorizados se llevaron en completa concordancia con los principios de la Declaración de Helsinki y con las leyes y directivas locales relacionados con estudios clínicos. Después de la autorización del protocolo por el Comité de Ética del Cantón de Lucerna y la notificación a la administración federal suiza de salud pública, 80 voluntarios sanos (edades: de 18 a 64 años) dieron su consentimiento escrito informado para participar. Se excluyeron voluntarios si en el momento de la inmunización presentaban síntomas de una enfermedad aguda o crónica o si existía un tratamiento simultáneo con medicamentos inmunosupresores o una conocida debilidad inmunológica.

ES 2 279 650 T3

Las formulaciones de vacuna intranasales se administraron a cada uno de tres grupos de 20 voluntarios (Tabla 1). Los grupos A y B recibieron 2 dosis de la formulación A o B en cada orificio nasal en el día 1, y 2 dosis una semana más tarde. El grupo C obtuvo dos dosis de formulación A de concentración doble en el día 1. El grupo D fue vacunado intramuscularmente en la zona del deltoides con la formulación parenteral. Se tomaron muestras de sangre y de saliva (Omnisal[®], GB) inmediatamente antes de la primera inmunización y un mes después de la primera inmunización (día 29 ± 2). Debido a un problema técnico sólo pudieron evaluarse las muestras de saliva de las primeras 47 personas. La citología de cepillado de los orificios nasales fue llevada a cabo antes de la inmunización y en los días 4, 8 y 1 mes después de la inmunización inicial.

Para los análisis se codificaron las muestras de sangre y las muestras de saliva.

La inmunorespuesta de suero frente a los componentes de vacuna-HA se determinó mediante un ensayo estándar bajo utilización de cuatro unidades de hemaglutinina de los antígenos correspondientes. Los sueros fueron tratados antes del ensayo durante 30 minutos a 56°C. Los títulos se expresan como valor recíproco de la dilución más elevada del suero que impedía por completo la hemaglutinación. Se consideró como protector un título $\geq 1:40$.

Los anticuerpos-IgA globales e influenza-específicos se determinaron mediante procedimientos ELISA conocidos (Tamura SI, Ito Y, Asanuma H *et al.*, Cross-protection against influenza virus infection afforded by trivalent inactivated vaccines inoculated intranasally with cholera toxin B subunit, J, Immunol. 149 (1992) 981-987). Los valores de Ig virus-específicos se expresaron como unidades de ELISA de IgA específico por μg de concentración total de IgA.

Las células epiteliales de nariz se reunieron exclusivamente de los maxilloturbinados de ambas fosas nasales en cada persona con el mismo tipo de un pequeño cepillo de nylon que el empleado en las investigaciones citopatológicas durante la broncoscopia (Glück U, Gebbers J-O, Nasal cytopathology in smokers: a possible biomarker or fair-pollution? Am. J. Rhinol. 10 (1996) 55-57). La toma de muestras se efectuó por el mismo investigador (U.G.) bajo control rinoscópico con un movimiento rotante y traslacional a lo largo de la fijación inferior de los turbinados. Las células se transfirieron a un portaobjeto de vidrio y se las fijó de inmediato en una solución de 200 ml de etanol + 100 ml de acetona + 6 gotas de ácido tricloroacético.

Los portaobjetos, teñidos según Papanicolaou, fueron investigados por patólogos, que se habían capacitado en el Institut für Pathologie in Cytopathologie (Instituto de Patología en Citopatología), Hospital Cantonal de Lucerna, y que no habían sido informados acerca del estado de vacunación.

Los conteos celulares promedios de células ciliadas, células caliciformes, linfocitos, centoblastos, neutrófilos, eosinófilos y células epiteliales escamosas, se determinaron en 25 zonas representativas para cada portaobjetos, a 100 x.

La significancia entre los títulos de línea básica y de postinmunización se determinó mediante un ensayo Paired-T. Las diferencias en la capacidad de las 4 vacunaciones, de anticuerpos Anti-HA en los grupos de estudio, se determinaron mediante X^2 .

Todos los acontecimientos desfavorables observados durante el estudio clínico debían registrarse. Por definición, un acontecimiento desfavorable era una variación desventajosa del estado de línea básica (prevacunación) de las personas, independientemente de si el acontecimiento se considerase relacionado con la vacunación o no. Los acontecimientos desfavorables (reacción local o sistémica) que se presentaron después de la inmunización, fueron registrados por el clínico sobre un formulario informativo especial para acontecimientos desfavorables. La pendiente de la línea básica de los acontecimientos desfavorables se determinó antes de la inmunización.

Para el estudio se reclutaron 80 personas con una edad promedio de 40 años y con status social comparable. El 27,5% de los participantes eran femeninos. La totalidad de los tres preparados de vacunación nasales así como las vacunas parenterales fueron bien toleradas. Desde el punto de vista de la anamnesis no hubo una diferencia significativa entre los 3 grupos de material de vacunación nasal, y la totalidad de las 3 formulaciones fueron bien toleradas. En casos individuales se informó acerca de posibles reacciones acompañantes posteriores: fiebre, cansancio, náuseas, rinitis, nariz obstruida y rinofaringitis. También las vacunas virosomales parenterales fueron muy bien toleradas.

La inmunorespuesta serológica se muestra en la Tabla 2. Se midieron incrementos significativos en los títulos en el grupo A (2 vacunas nasales con una separación de 7 días), grupo C (1 vacunación nasal, dosis doble), así como en el grupo D (vacunación parenteral contra la totalidad de las 3 cepas de virus). Las medias geométricas más elevadas de los títulos de anticuerpos (GMT) se encontraron en los grupos A y D. El grupo D tenía significativamente el valor de GMT mas elevado contra la cepa H1N1 ($p \leq 0,05$). En el caso de la cepa H3N2 no hubo diferencias significativas entre los grupos A y D.

Estos grupos reaccionaron de manera significativamente mejor que los grupos B y C. En el caso de la cepa B no hubo diferencias significativas en los grupos A, C y D. Sin embargo, éstos mostraron títulos significativamente mas elevados que el grupo B. Los coeficientes de conversión de suero mas elevados correspondieron a los grupos A y D. Habitualmente eran significativamente mas elevados que los índices de los grupos B y C y satisfacían para la totalidad de las 3 cepas los requisitos serológicos de vacuna parenteral contra la influenza conforme a las Directivas de la Comunidad Europea (Comisión de la Comunidad Europea, Richtlinien fuer Medizinprodukte in der Europaesichen

ES 2 279 650 T3

Gemeinschaft. Harmonisierung der Anforderungen an Influenzavakzine (1992), páginas 93-98. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Comunidad Europea).

5 La inmunorespuesta humoral mucosal (saliva) está indicada en la Tabla 3. Los incrementos más elevados en título de IgA se midieron en el grupo A. Estos eran significativamente mejores que en los otros grupos. Teniendo en cuenta el IgA global, los GMT en el grupo A también eran los más elevados. El índice de conversión de muco (cuádruple incremento de título de IgA) fue nuevamente mas elevado en el grupo A. En el caso de la vacunación intramuscular hubo solamente índices de conversión de muco muy débiles.

10 La citología por cepillado de la mucosa nasal fue llevada a cabo en los grupos A, B y C. Los resultados se han resumido en la Figura 5. Hemos determinado el recuento celular del epitelio de mucosa nasal (células cilíndricas ciliadas y no ciliadas, células caliciformes y células epiteliales escamosas) y de las células de los mielo/mono- y linfopoeisis (linfocitos, eosinófilos, neutrófilos y centroblastos). En el grupo A pudo comprobarse una manifiesta hiperplasia de células caliciformes en el día 4º y 8º después de la primera vacunación. Además, hemos observado
15 un fuerte incremento de linfocitos y de centroblastos en los mismos días. Además, se observó un incremento en eosinófilos y neutrófilos en el día 8º después de la vacunación inicial. La cantidad de células cilíndricas se mantuvo sin cambios.

20 En el grupo B hubo solamente un ligero incremento en linfocitos, granulocitos neutrófilos y granulocitos. En este grupo no hubo indicios de linfocitos activados.

25 En el grupo C se comprobó una hiperplasia de células caliciformes aún mas fuerte que en el grupo A. Además, en este grupo los granulocitos eosinófilos y neutrófilos se habían incrementado más fuertemente en los días 4 y 8. En este grupo, el incremento en linfoblastos fue mas débil que en el grupo A. $p = \leq 0,05$. Un mes después de la primera vacunación, se había restablecido en los todos los grupos el estado anterior de la composición de las células.

30 La Figura 5 se refiere a la citología nasal: cuantificación de las diversas poblaciones celulares, que se obtuvieron mediante técnica de frotis nasal de los individuos (a razón de 20 por cada grupo) hasta 29 días después de tres tipos diversos de la vacunación intranasal. Obsérvese el manifiesto incremento de los centroblastos como indicio de una inmunorespuesta local en el grupo A, en contraste con el incremento, significativamente menor, en los grupos B y C ($p < 0,005$).

Ejemplo 8

35 *Comparación de la eficacia clínica de vacunas intranasales virosomales contra influenza con HLT o PCG en voluntarios humanos, administradas mediante un nuevo aparato de spray, que se describe en la presente invención*

40 La inmunorespuesta y tolerabilidad de dos vacunas de spray anti-influenza se investigaron en un estudio doblemente a ciegas, que fue llevado a cabo con en total 158 voluntarios suizos sanos con edades de 18 a 67 años.

45 Una vacuna trivalente virosomal contra influenza (HA purificado, formulado con fosfatidilcolina) se combinó con HLT (Heat Labile Toxin) de *E. coli* en un formato que es adecuado para la administración intranasal. Una dosis humana contenía 7,5 μg de HA de cada cepa de influenza y 2 μg de HLT. Se administró una dosis en cada orificio nasal en los días 1 y 8 en grupos de individuos en edades de 18-59 o de ≥ 60 años. Se tomaron muestras de suero después de aproximadamente 4 semanas después de la inmunización. Las reacciones fueron raras y débiles. Los porcentajes de personas (adultos o mayores), que alcanzaron un título de anticuerpos suero-anti-HA protector (≥ 40) eran como sigue: A/Baviera (92%, 91%). A/Wuhan (92%, 78%), y B/Beijing (59%, 50%). Los GMT después de la inmunización y los múltiplos del aumento de GMT eran comparables entre ambos grupos de edades. El porcentaje de personas (adultos o mayores), que poseían un título de línea básica no protector, pero que después de la inmunización alcanzaron niveles protectores, era como sigue: A/Baviera (79%, 85%), A/Wuhan (86%, 56%) y B/Beijing (48%, 41%).

55 Un segundo preparado mucosal contenía 75 μg de HA y 12 μg de procoleragenoide (PCG). Este preparado también fue muy bien tolerado y demostró ser un tanto menos inmunógeno que el preparado de HLT. El porcentaje de personas que alcanzaron un título de anticuerpos de suero-Anti-HA protector, era como sigue: A/Baviera 94,2%, A/Wuhan 80,8% y B/Beijing 36,5%. Los índices de seroconversión de todos los grupos se muestra en la Tabla 4.

Estos resultados muestran que la vacuna virosomal contra influenza administrada intranasalmente, es segura y muy inmunógena en personas adultas, personas mayores incluidas.

60 Ejemplo 9

Inmunorespuesta de la mucosa en ratones después de utilización intranasal de una vacuna virosomal contra influenza con HLT, con PCG o sin adyuvante mucosal adicional

65 Grupos de 10 ratones Balb/c hembra adultos fueron vacunados intranasalmente con 30 μl sea de la vacuna contra influenza descrita en el Ejemplo (1) sea con la vacuna contra influencia descrita en el Ejemplo (2). Un grupo de control de 10 ratones recibió un preparado de vacuna virosomal sin adyuvante adicional, pero con la misma composición de virosomas. Una mitad de cada grupo recibió una segunda dosis intranasal una semana después. Tres semanas mas

ES 2 279 650 T3

tarde se llevaron a cabo lavados nasales (NW, Nasenwäschen) y enjuagues bronquioalveolares (BAL, bronchoalveolarspülungen). Tabla 5, correspondiente al Ejemplo 9. La determinación del IgA específico se llevó a cabo mediante un procedimiento ELISA conocido. Los resultados (GMT) se han resumido en la Tabla 6.

5 Los GMT mas elevados para la totalidad de las tres cepas de vacuna (A/Johannesburgo, B/Nanquin, B/Harbin) pudieron determinarse en los grupos que habían sido vacunados dos veces con la vacuna conforme al Ejemplo (1). Este grupo reaccionó aún con los niveles de IgA mas elevados en los BAL, después de que los mismos hubiesen sido vacunados solamente una vez.

10 Una respuesta de IgA satisfactoria también se obtuvo en los grupos de ratones que habían sido vacunados dos veces intranasalmente con el preparado del Ejemplo (2). El grupo de control, en el que se había aplicado el preparado de virosomas sin adyuvante mucosal adicional, sólo mostró una innumorespuesta mucosa muy débil.

15 Los resultados muestran que en ratones, una vacuna virosomal contra influenza, administrada por vía intranasal, que contenían un adyuvante mucosal, podía inducir una elevada respuesta de anticuerpos en las mucosas.

Estudios preclínicos de las vacunas virosomales contra influenza en ratones: aplicación intranasal

(Tabla 5 para el ejemplo 9)

20

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
25	Día 0	Virosomas de influenza + HLT i.n.	Virosomas de influenza + HLT i.n.	Virosomas de influenza + PCG i.n.	Virosomas de influenza + PCG i.n.	Virosomas de influenza
30	Día 7	Virosomas de influenza + HLT i.n.	—	Virosomas de influenza + PCG i.n.	—	Virus de Influenza i.n.
35	Día 28	NW & BAL	NW & BAL	NW & BAL	NW & BAL	NW & BAL

40

Anticuerpos de IgA-influenza en ratones

GMT de los títulos inversos (ELISA)

45

(Tabla 6 para ejemplo 9)

50

Grupos	H1N1 NW	H1N1 BAL	H3N2 NW	H3N2 BAL	B NW	B BAL	
55	1	320	12.800	380	3.200	320	9.220
	2	neg.	140	neg.	24	neg.	1.540
	3	160	760	470	760	220	770
60	4	neg.	neg.	neg.	neg.	10	neg.
	5	4	neg.	neg.	neg.	4	neg.
65	6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

ES 2 279 650 T3

Ejemplo 10

Evaluación clínica de una vacuna mucocal contra Hepatitis-B (HBs-)

5 La vacuna se preparó conforme al Ejemplo 4 y se introdujo en un aplicador-atomizador nasal conforme al Ejemplo 5. El producto se ensayó en 10 voluntarios: en el día 1 se aplicaron 100 μ l por cada fosa nasal, y se repitió una semana después. Se extrajeron muestras de sangre el día 1 (antes de la vacunación) así como el día 29. Los anticuerpos anti-HBs se determinaron mediante RIA (Abbott). La media geométrica de los títulos antes de la vacunación era de 7 UI/ml, y en el día 29, de 159 UI/ml.

10

Ejemplo 11

Inmunorespuesta mucosal de las mucosas de ratones después de utilización intranasal de un plásmido de ADN, que codifica el antígeno HN del virus de paperas, introducido en virosomas de influenza, que contenían 10% de fosfolípidos catiónicos, y mezclado con HLT (5 μ g/ml)

15

Hemos inmunizado grupos de ratones intranasalmente con a) ADN desnudo que codificaba el antígeno-HN del virus de paperas (grupo C) ó b) ADN encerrado en virosomas después de preinmunización con virosomas (grupo A) ó c) sin preinmunización (grupo B). Un grupo de control (H) fue inmunizado por vía i.n. con virus de paperas de Urabe vivo (Priorix, SKB Rixenzsart). Como se muestra en la Tabla 7, la media geométrica del título (GMT) del IgG en el grupo de ratones que habían recibido la preinmunización (A), era mas elevada que la descrita en los grupos B y C de los ratones (Lovell GH: Proteosomes, hydrophobic anchors, iscoms and liposomes for improved presentation of peptide and protein vaccines. En: New Generation Vaccines (1990) (G.C. Woodrow und M.M. Levine, Editores) Dekker, Nueva York, página 141-168; Cusi MG und Glück R: Intranasal immunization of mice with mumps DNA entrapped into influenza virosomes, IBC's 4th Annual Conference on Genetic Vaccines, 25-27. Okt. 1998, Washington DC). El grupo de ratones que se habían inmunizado con ADN desnudo, desarrolló un nivel de IgG muy bajo, mientras que en cambio los ratones que habían sido inmunizados por vía i.n. con virus de paperas (grupo H) mostraron una buena respuesta de IgG. En el análisis de la inmunidad de las mucosas descubrimos que todos los grupos de ratones, excepto los inmunizados con ADN desnudo, desarrollaban IgG. Solamente en los lavados nasales (NW, Nasenwäschen) de los ratones inmunizados por vía i.n. con el virus de paperas pudimos determinar un título aumentado en IgG (grupo H).

20

Se llevaron a cabo mediciones de citoquina bajo utilización de células primarias de bazo de bazo de ratón, que se habían extraído doce días después de la inmunización. La Tabla 8 resume mediciones representativas, que se habían obtenido de dos experimentos separados. Células estimuladas con antígeno de virus de paperas, de ratones que anteriormente se habían vacunado (i.n.) con virosomas de ADN, indujeron la producción de IL-2 y IFN- γ . Además, ratones infectados con gripe indujeron la producción de IL-4. Células tomadas de animales inmunizados con virus de paperas produjeron IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 después de estimulación *in-vitro* con antígeno de paperas. La inmunización con virosomas de ADN, así como la inmunización de control con los antígenos paperas purificados se correlacionaban con el fenotipo Th1. Además, considerado desde el punto de vista de la relación entre el nivel global de IgG y el IgG1 ó IgG2a, virus-específicos, predominó la cantidad de isotipo IgG2a en el grupo A, lo que indica una respuesta de Th2.

25

30

TABLA 7

La media geométrica del título (GMT) de IgG humoral, IgA en el enjuague broquioalveolar (BAL, Bronchoalveolarpülung) e IgA en el lavado nasal de ratones

35

RATONES	IgG	BAL IgA	NW IgA
Grupo A	356	8	10
Grupo B	15	11	10
Grupo C	12	2	2
Grupo H	1.585	2	20

40

45

50

55

60

ES 2 279 650 T3

TABLA 8

Mediciones representativas de la producción de citoquinas en ratones, obtenidas a partir de de dos experimentos separados

5

Grupo	Il-2	IFN- γ	IL-4	IL-10
A	300	300	150	0
B	150	625	0	0
C	300	100	0	0
D	600	100	150	600

10

15

Ejemplo 12

20

Tratamiento de nariz obstruida en voluntarios mediante virosomas de influenza con y sin HLT en un nuevo aplicador de atomización

25

En una clínica se seleccionaron 30 voluntarios con síntomas de resfriado y obstrucción nasal aguda. Para la totalidad de los voluntarios se midió la intensidad respiratoria rinonanométrica (en Pascal) para cada orificio nasal individualmente. Seguidamente se los aleatorizó y subdividió en 3 grupos de 10. El grupo A obtuvo una dosis de vacuna (100 μ l en cada fosa nasal) de acuerdo con el Ejemplo (1), el grupo B recibió la misma dosis, sin embargo sin el adyuvante mucosal HLT. El grupo C recibió en cada caso NaCl al 0,9% (solución fisiológica salina) en cada orificio nasal. Las corrientes de aire se midieron 15 min, 30 min, 1 hora así como 2 horas más tarde.

30

Los datos de medición se han resumido en la Tabla 9. Tanto en el Grupo A como en el Grupo B los valores eran significativamente mejores que en el Grupo C. En ambos grupos pudo comprobarse una manifiesta mejora de las funciones respiratorias.

35

TABLA 9

Valores rinonanométricos geométricos medios en voluntarios antes y después del tratamiento de atomización

40

Grupo	Intensidad Respiratoria en Pascal				
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
A	490	693	712	681	521
B	497	687	705	672	538
C	488	497	513	521	501

50

Ejemplo 13

55

Tratamiento de lesiones en las mucosas de voluntarios mediante virosomas de influenza y HLT

60

Se vacunaron voluntarios intranasalmente, como descrito en el Ejemplo (7). Tal como se describió aquí, se determinaron las células caliciformes promedios a los 3, 7 y 28 días después de la vacunación intranasal. Pudimos determinar modificaciones epiteliales con hiperplasia de células caliciformes en frotis citológicos (Glück U, Gebber J-O: Nasal cytopathology in smokers: a posible biomarker o air pollution? Am. J. Rhinol. 10 (1996) 55-57). Las células caliciformes tienen una función de protección para la capa de mucosa. Un mes después de la primera vacunación nasal, la condición celular de la mucosa era significativamente mejor en comparación con el estado anterior.

65

Por ello, estas nuevas vacunas pueden utilizarse como agente terapéutico para el tratamiento de una mucosa nasal en estado dañado.

ES 2 279 650 T3

Ejemplo 14

Prevención de diarrea enterotóxica por E. coli mediante aplicación nasal de HLT con y sin virosomas de influenza

5 Un grupo de viajeros, que visitaban Túnez, consistía en 38 personas. Después de una aceptación informada, todos los participantes consintieron en el estudio. Después de aleatorización se vacunaron 19 voluntarios dos veces con intervalos de 1 semana con el preparado conforme al Ejemplo (1); en cambio, 19 personas no recibieron ninguna vacuna. 28 días después de la primera vacuna intranasal se tomaron muestras de sangre de todos los voluntarios. Las 19 personas vacunadas mostraron elevados niveles de IgG en el suero con respecto al adyuvante mucosal (HLT). El grupo de control permaneció anti-HLT-negativo. Antes de salir de Túnez, un mes después, se distribuyó un cuestionario especial sobre eventos de salud a todos los participantes. El grupo regresó de Túnez 20 días después, y se evaluó el cuestionario sobre eventos de salud en busca de enfermedades diarreicas. En el grupo de los vacunados sólo dos personas informaron haber tenido problemas de diarrea, mientras que en cambio en el grupo no vacunado, 9 personas sufrieron de diarrea durante su estadía en Túnez. Estos datos muestran que la vacuna también es eficaz para prevenir diarrea de la enfermedad enterotóxica por *E. coli*.

Ejemplo 7

TABLA 1

Protocolo clínico

Grupo de vacuna	N (varones)	Edad media en años	Cantidad de vacunación en (intervalo)	Aplicación	Composición en µg vacunación completa: HA por cepa	Composición en µg vacunación completa: HLT
A	20 (14)	39,7	2 (1 semana)	Intranasal	15	2
B	20 (14)	35,5	2 (1 semana)	Intranasal	15	--
C	20 (16)	43,8	1	Intranasal	15	2
D	20 (14)	41,2	1	intramuscular	15	--

REIVINDICACIONES

5 1. Manguito (24) con un dispositivo de unión (28) para la disposición de un dispositivo de entrega (2), en especial
para la entrega por atomización de una sustancia farmacéuticamente activa, y un dispositivo de apoyo (30), estando
el dispositivo de unión (28) y el dispositivo de apoyo (30) dispuestos de manera que juntos definen un ángulo de
atomización óptimo (α) para la entrega de la sustancia desde el dispositivo de entrega, estando el dispositivo de apoyo
(30) en el lado del usuario, curvado de manera que esencialmente corresponde a la forma de una sección exterior
del labio superior de un usuario, y teniendo el ángulo de atomización (α) un valor entre 50° y 80° con respecto a la
10 horizontal).

2. Manguito (24) conforme a la reivindicación 1, en donde el dispositivo de unión (28) es una sección de tubo
esencialmente cilíndrica.

15 3. Manguito (24) conforme a la reivindicación 2, en donde la sección de tubo (28) puede deslizarse por lo menos
sobre una parte de una pieza nasal (20) del dispositivo de entrega (2).

4. Manguito (24) conforme a una de las de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el manguito (24) puede disponerse
20 bloqueado a la rotación sobre el dispositivo de entrega (2).

5. Manguito (24) conforme a la reivindicación 4, en donde la sección de tubo (28) y la parte de la pieza nasal (20),
sobre el que puede deslizarse la sección de tubo (28), están configuradas por lo menos en parte en forma de polígono,
a efectos de configurar un bloqueo contra la rotación.

25 6. Dispositivo de entrega (2), en especial para la entrega por atomización de una sustancia farmacéuticamente
activa con un dispositivo de bomba (6), un manguito de dedos (10) para el accionamiento del dispositivo de bomba
(6), un elemento de empalme (8) para la unión hermética con un recipiente de contenido (4) y una pieza nasal (16) que
presenta una primera sección (18) y una segunda sección (20), estando ambas secciones (18, 20) de la pieza nasal (16)
dimensionadas de manera tal, que una abertura de atomización (14) de la pieza nasal (16) sobresale esencialmente
30 hasta en la cavidad principal de la nariz de un paciente, presentando el dispositivo de entrega (2) además un manguito
(24) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Dispositivo de entrega (2) conforme a la reivindicación 6, en donde por lo menos la segunda sección (20) de la
pieza nasal (16) tiene una configuración esencialmente cilíndrica.

35 8. Dispositivo de entrega (2) conforme a la reivindicación 7, en el que el diámetro de la segunda sección (20) es de
3 mm a 10 mm, y es preferentemente de aproximadamente 7 mm.

9. Dispositivo de entrega (2) conforme a una de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la segunda sección (20) de la
40 pieza nasal (16) presenta una longitud entre 5 y 50 mm, preferentemente de aproximadamente 20 mm.

10. Dispositivo de entrega (2) conforme a una de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la primera sección (18) de la
pieza nasal (16) presente una longitud entre 10 y 40 mm, preferentemente de aproximadamente 30 mm.

45 11. Dispositivo de entrega (2) conforme a una de las reivindicaciones 6 a 10, siendo la distancia entre el man-
guito para los dedos, (10), y la abertura de atomización (14) prevista en una de las puntas, de por lo menos 30 mm,
preferentemente de aproximadamente 45 mm.

50 12. Dispositivo de entrega (2) conforme a la reivindicación 6, que está configurado solidariamente con el manguito
(24) o que forma una sola pieza con el mismo.

55

60

65

FIG. 1

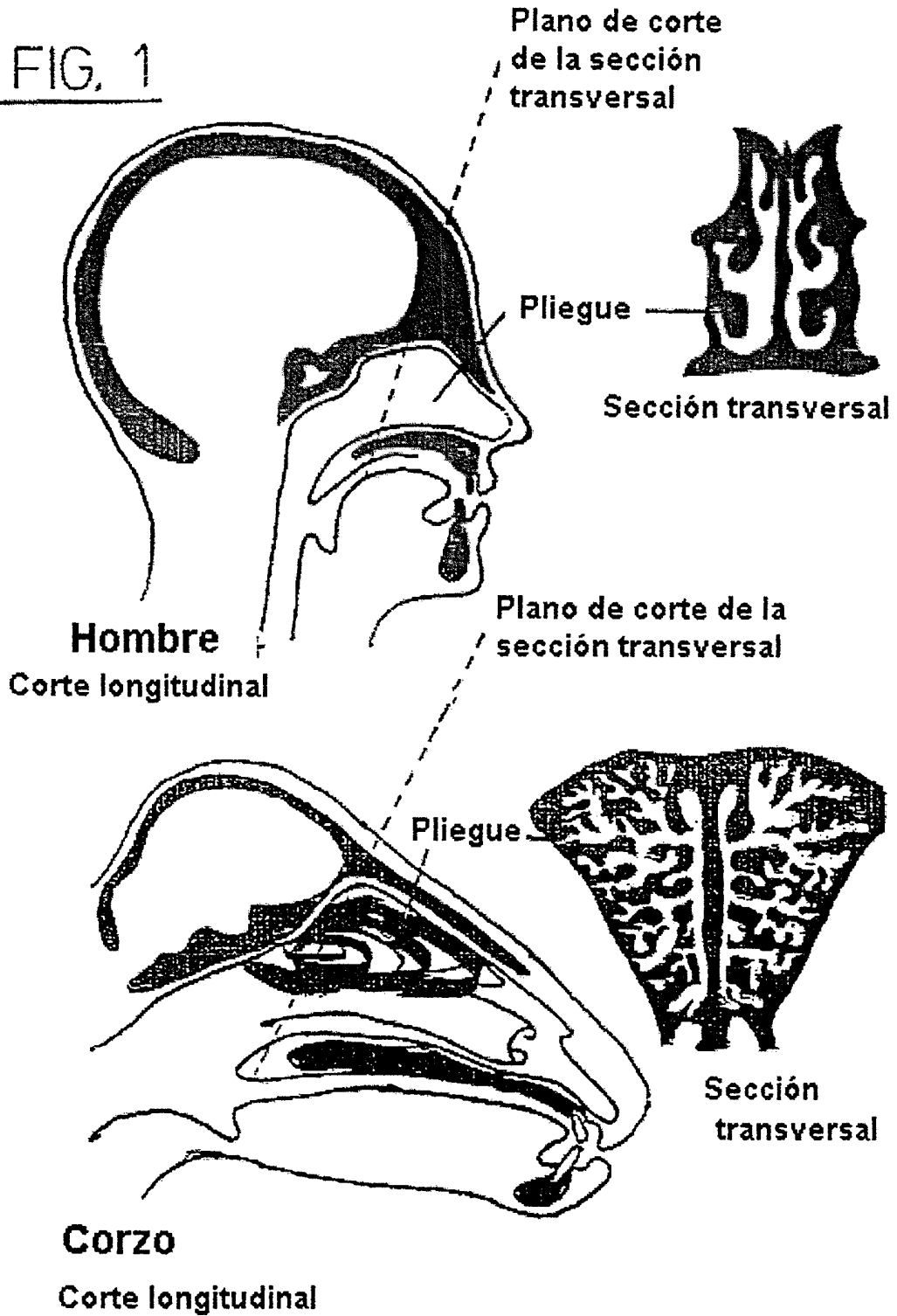
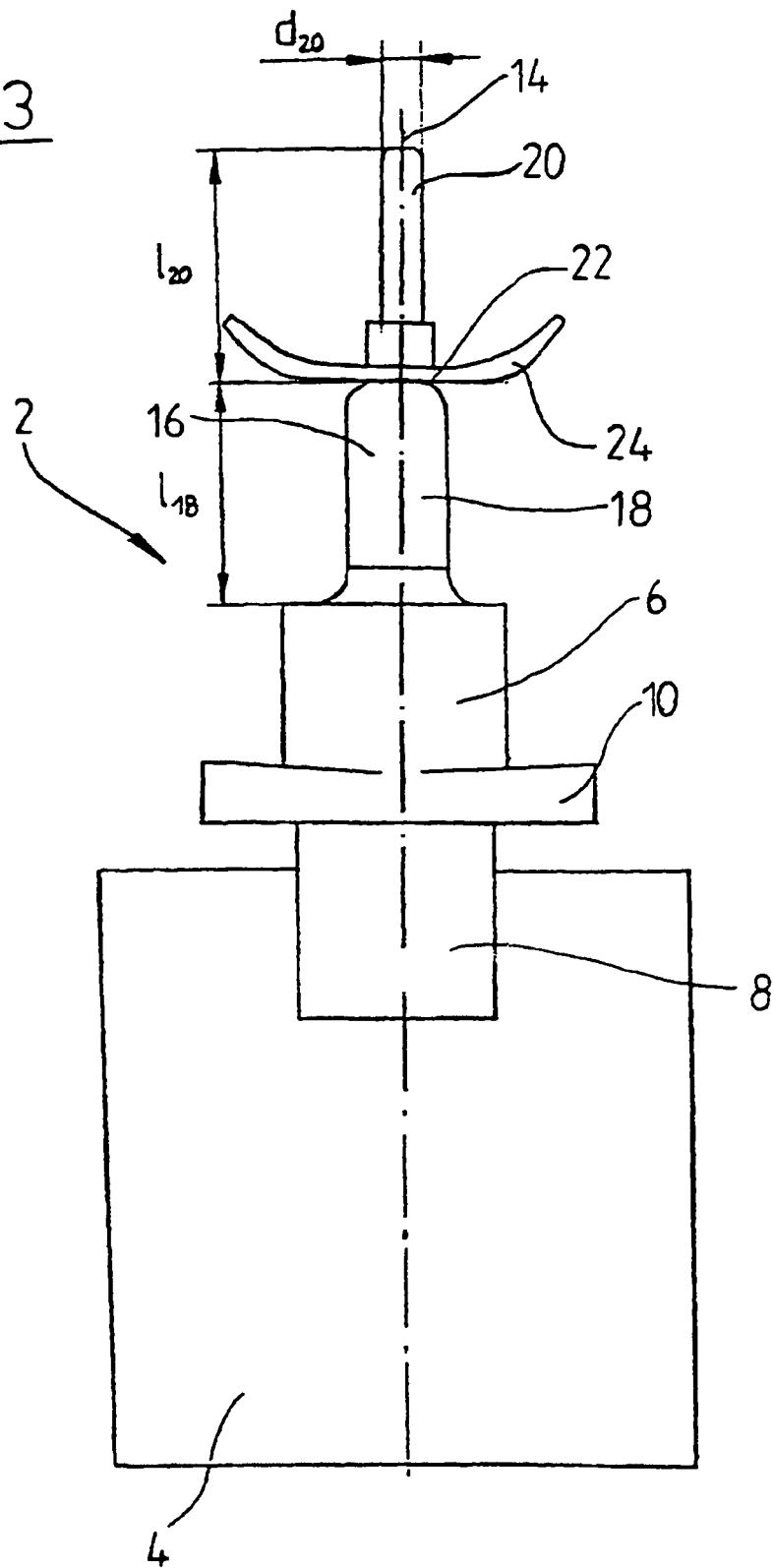




FIG. 2

FIG. 3



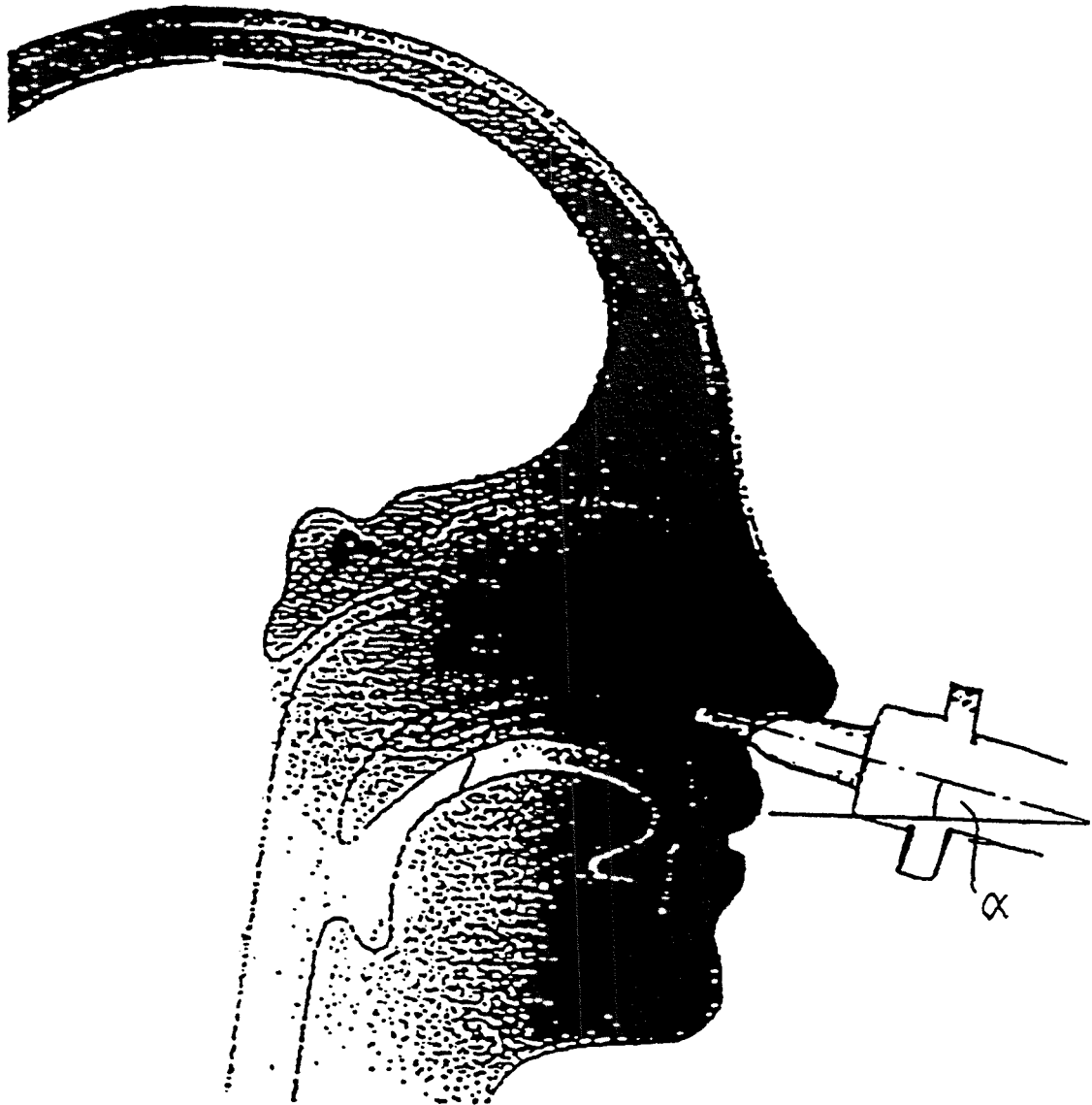


FIG. 4

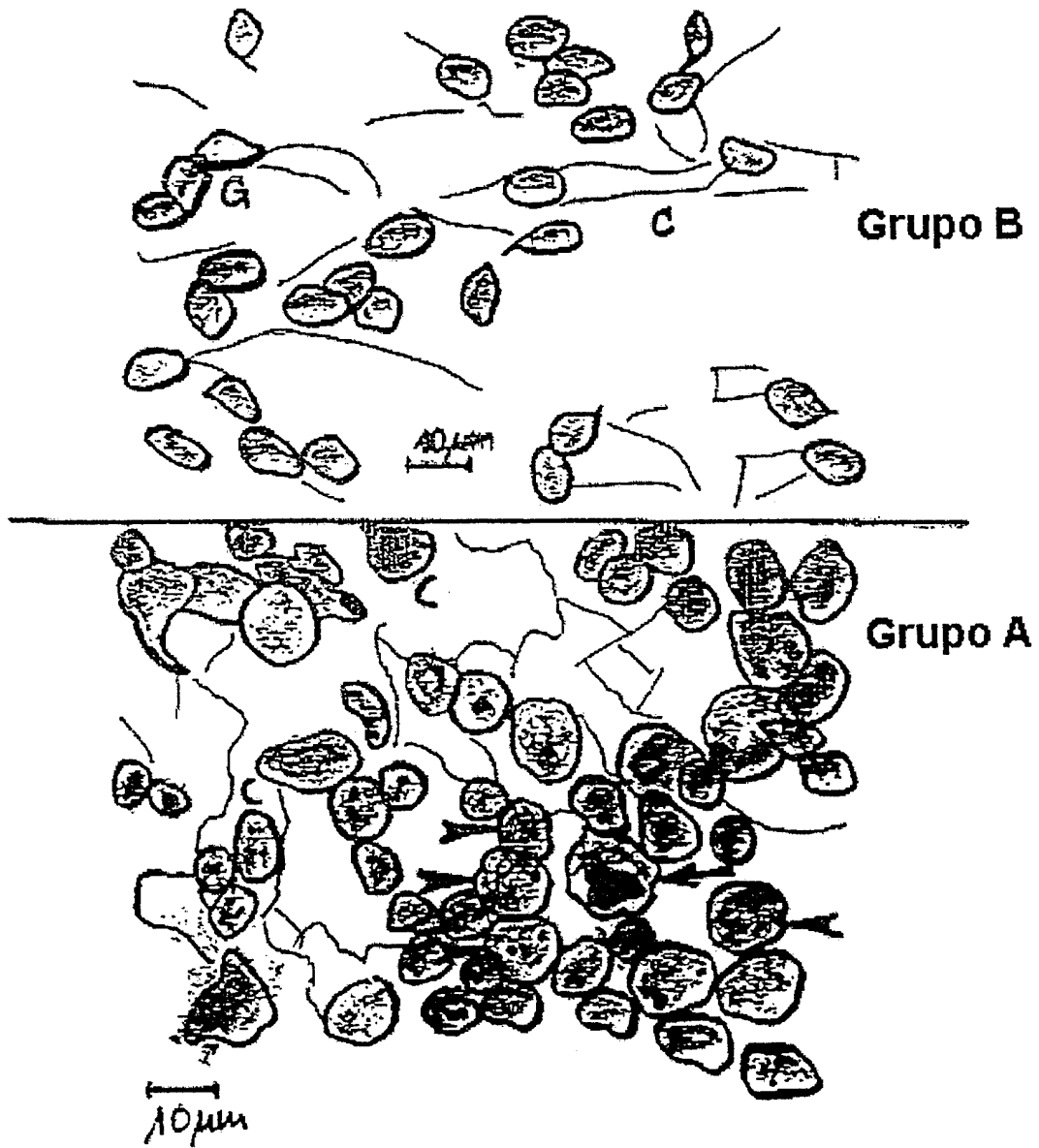


FIG. 5

