



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 911 116**

⑮ Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01)	A61P 37/04	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)	C12N 15/117	(2010.01)
A61K 31/713	(2006.01)		
A61K 47/24	(2006.01)		
A61K 47/36	(2006.01)		
A61K 47/38	(2006.01)		
A61P 31/16	(2006.01)		
A61P 11/00	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		
A61P 31/12	(2006.01)		

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2013 PCT/EP2013/059079**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13164380**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2013 E 13722334 (3)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022 EP 2846767**

⑮ Título: **Formulaciones de ácido poliinosínico-policitidílico (poli (I:C)) para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias altas**

⑩ Prioridad:

03.05.2012 EP 12166595

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.05.2022

⑮ Titular/es:

**JANSSEN SCIENCES IRELAND UNLIMITED COMPANY (100.0%)
Barnahely, Ringaskiddy
Co Cork, IE**

⑯ Inventor/es:

**MALCOLM, BRUCE ALBERT;
SUTMULLER, ROGER PAULUS MARIA y
BAERT, LIEVEN ELVIRE COLETTE**

⑯ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 911 116 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

5 Formulaciones de ácido poliinosínico-policitidílico (poli (I:C)) para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias altas

10 La presente invención se refiere a una composición que consiste en micropartículas, donde las micropartículas consisten en ácido poliinosínico-policitidílico (Polí(I:C)) y un polímero portador de almidón. La presente invención también se refiere al uso de la composición anterior para tratar y/o prevenir infecciones o el resfriado común, y a un sistema de suministro nasal, que comprende dicha composición.

15 10 El resfriado común (conocido también como nasofaringitis, rinofaringitis vírica aguda, coriza aguda o un catarro) es una enfermedad infecciosa vírica de las vías respiratorias altas provocada fundamentalmente por virus.

15 *Virus*

20 15 El resfriado común es una infección vírica de las vías respiratorias altas. El virus causante más común es el rinovirus (30-50%), un tipo de picornavirus con 99 serotipos conocidos. Otros incluyen coronavirus (10-15%), virus de la gripe (5-15%), virus paragripales humanos, virus sinticial respiratorio humano, adenovirus, enterovirus y metapneumovirus.

25 20 En total, más de 200 tipos de virus serológicamente diferentes provocan resfriados. Los coronavirus están relacionados en particular con los resfriados de los adultos. De entre más de 30 coronavirus, 3 o 4 provocan infecciones en los seres humanos, pero es difícil cultivarlos en el laboratorio y, por lo tanto, su trascendencia no se comprende del todo bien. Debido a los numerosos tipos de virus diferentes y a su tendencia a mutar continuamente, es imposible conseguir inmunidad total al resfriado común.

30 25 *Signos y síntomas clínicos*

35 30 La primera indicación de un virus que afecta a las vías respiratorias altas suele ser picor o dolor en la garganta. Otros síntomas comunes son el goteo nasal, la congestión y los estornudos. Estos síntomas a veces van acompañados por conjuntivitis (ojo rojo), dolores musculares, fatiga, malestar, dolor de cabeza, debilidad o pérdida del apetito. La tos y la fiebre generalmente indican que se trata de la gripe en vez de un virus que afecta las vías respiratorias altas con un valor predictivo positivo de aproximadamente un 80%. Los síntomas pueden ser más fuertes en los bebés y los niños pequeños, y en estos casos pueden incluir fiebre y urticaria. Los virus que afectan a las vías respiratorias altas también pueden afectar más a los fumadores.

40 35 La replicación vírica comienza de 2 a 6 horas después del contacto inicial. Los síntomas suelen comenzar de 2 a 5 días después de la infección inicial, pero en ocasiones pueden presentarse en tan solo 10 horas. Los síntomas se agudizan 2-3 días después de su aparición, mientras que la aparición de los síntomas de la gripe es constante e inmediata. En la actualidad, no existe ningún tratamiento conocido que reduzca su duración; sin embargo, los síntomas normalmente desaparecen de forma espontánea en 7-10 días, aunque algunos síntomas pueden durar hasta tres semanas. En los niños, la tos dura más de 10 días en un 35-40% de los casos y persiste durante más de 25 días en el 10% de los casos. El resfriado común es una enfermedad infecciosa más frecuente en los seres humanos contrayendo el adulto común de dos a cuatro infecciones al año y el niño común, con una edad comprendida entre 6-12 años, varias infecciones al año. En los Estados Unidos, la incidencia de resfriados es mayor en el otoño y el invierno, teniendo lugar la mayoría de las infecciones entre septiembre y abril. La estacionalidad se puede deber al inicio del año escolar o a que las personas pasan más tiempo en espacios cerrados (más cerca de otras personas) lo cual incrementa la posibilidad de transmisión del virus.

50 45 *Periodo infeccioso*

55 50 El resfriado común es más infeccioso entre los dos y tres primeros días de los síntomas, sin embargo también puede ser infeccioso durante un par de días antes de la aparición de los síntomas y sigue siendo infeccioso en cierta medida hasta que los síntomas han desaparecido por completo.

55 55 *Rinovirus humano*

60 60 El rinovirus humano es un miembro del género de los enterovirus perteneciente a la familia *Picornaviridae*. La partícula RVH está compuesta por una cápside 27-30 nm que carece de envoltura y que está constituida por 4 polipéptidos (VP1, VP2, VP3 y VP4). La cápside vírica contiene un genoma de ARN monocatenario de aproximadamente 7200 bases. El extremo 5' del genoma de ARN está unido covalentemente a una proteína codificada por el virus (VPg). El curso clínico de la infección por el rinovirus humano (RVH) se ha caracterizado debidamente. El RVH puede infectar las vías respiratorias altas y bajas, la mucosa nasal, los senos y el oído medio, y las infecciones producen síntomas del "resfriado común" (véanse anteriormente). Las infecciones se autolimitan y normalmente se restringen a las vías respiratorias altas. Los recuentos de linfocitos periféricos pueden ser altos durante los 2-3 primeros días de la infección.

La infección por VRH también puede provocar la infección de las vías respiratorias bajas, otitis media (en particular en los niños pequeños) y sinusitis. Las complicaciones graves (tales como neumonía) debidas a la infección por el rinovirus son poco frecuentes y se ha informado de casos en bebés y niños pequeños, en particular en aquellos con afecciones subyacentes tales como la displasia broncopulmonar, cardiopatías congénitas, prematuridad y afecciones neurológicas, y en adultos inmunodeprimidos (receptores de trasplantes de médula ósea). Mientras que otros miembros de la familia *Picornaviridae* pueden infectar el sistema nervioso central (es decir, poliovirus, enterovirus), no se ha detectado infección por RVH en el sistema nervioso central humano.

10 *Tratamiento*

No se dispone de agentes antivíricos comerciales para tratar las infecciones por rinovirus o prevenir resfriados comunes. El tratamiento de las infecciones de las vías respiratorias altas provocadas por rinovirus se basa en el tratamiento de los síntomas (estornudos, congestión nasal, rinorrea, irritación ocular, dolor de garganta, tos, dolores de cabeza, fiebre, escalofríos) normalmente utilizando antihistamínicos, aspirina, antitusígenos y descongestionantes nasales de venta sin receta. Las complicaciones más graves de la infección por el VIH (p. ej., neumonía) se tratan utilizando normas asistenciales adecuadas desde un punto de vista médico.

20 El documento JP 2009 209086 A divulga una vacuna con un tipo de administración mucosal que contiene Poli(I:C) como adyuvante. El documento CN 101757018 A divulga un polvo seco de Poli(I:C) utilizado para controlar enfermedades víricas de las aves de corral. El documento US 5804212 A divulga microesferas de almidón con carga farmacológica.

25 *Costos y necesidades médicas*

30 De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud se detectaron más de un mil millones de casos de resfriado común en EE. UU. el año pasado. En los Estados Unidos, el resfriado común es la causa de entre 75 y 100 millones de visitas al médico al año con una estimación a la baja de costos de 7700 millones de dólares estadounidenses. Los estadounidenses gastan 2900 millones de dólares en fármacos de venta sin receta y otros 400 millones de dólares en medicinas con receta para aliviar los síntomas. Se estima que hay entre 22 y 189 millones de ausencias escolares al año debidas a un resfriado. Como consecuencia, los padres faltan al trabajo 126 millones de días para quedarse en casa cuidando de sus hijos. Cuando esto se suma a los 150 millones de días laborales en los que los empleados están ausentes debido a un resfriado, el impacto económico total de pérdidas laborales debidas a los resfriados supera los 20 mil millones de dólares al año. Esto corresponde al 40% del tiempo de trabajo perdido.

35 Las células epiteliales de las vías respiratorias son la diana principal de los agentes infecciosos que afectan a las vías respiratorias altas (VRA) como los rinovirus y los coronavirus. Debido a que la infección por estos virus se produce antes de que aparezcan los síntomas lo cual refleja la eliminación de células infectadas por parte del sistema inmunitario, es poco probable que la intervención terapéutica antivírica directa sea muy efectiva. Además, es 40 muy difícil conseguir y mantener niveles activos de compuestos antivíricos directos en la mucosa nasal debido a su alto recambio. Por otra parte, ya se ha demostrado que la profilaxis, al explotar las propias defensas del cuerpo e inducir un estado antivírico en las células epiteliales nasales, ofrece una protección significativa contra una exposición posterior a un virus y también reduce los síntomas relacionados con la enfermedad.

45 Aunque los resfriados pueden durar solamente una semana o dos, los resfriados fuertes pueden durar hasta un mes. Los adultos padecen una media de dos a tres resfriados al año y los niños de seis a diez, dependiendo de su edad y exposición. Existen cientos de serotipos diferentes del virus del resfriado, lo cual hace que sea imposible desarrollar una profilaxis con una vacuna estándar que sea efectiva contra todos ellos.

50 El tratamiento sintomático normalmente implica el uso de antihistamínicos orales que producen somnolencia y/o descongestionantes vasoconstrictores con efectos secundarios estimulantes. Este tratamiento es únicamente marginalmente efectivo y estos efectos secundarios suelen ser tan debilitantes como la propia infección. Aunque la prevención sería la solución ideal, por las razones citadas anteriormente, es muy improbable que se desarrolle una vacuna efectiva de amplio espectro contra todos los serotipos diferentes en un futuro inmediato. Así pues, a menos 55 que se pongan en cuarentena, las personas estarán expuestas a estos agentes infecciosos frecuentemente, especialmente durante la "época de los resfriados" y por lo tanto un tratamiento profiláctico sin efectos secundarios, conveniente y efectivo de amplio espectro tendría una gran repercusión sobre la salud pública y la productividad en el puesto de trabajo.

60 La actuación específica sobre la respuesta inmunitaria innata, un "sistema de alarma temprano" para el cuerpo, resolvería los problemas mencionados anteriormente. Este sistema, presente en las células epiteliales nasales, una vez que ha sido estimulado debidamente, hace que las células crean que están siendo atacadas por un virus y desencadena una respuesta de defensa antivírica. Cuando esto ocurre, las células son refractarias a un ataque vírico posterior. Aunque a finales de 1980 se realizaron unas primeras investigaciones, que estudiaron la posibilidad de utilizar moléculas estimuladoras del sistema inmunitario, tales como interferón, para desencadenar una respuesta inmunitaria innata, su fabricación era costosa y sus efectos difíciles de controlar.

- 5 El objetivo de la presente investigación ha sido desarrollar una formulación de una molécula estimulante (Poli(I:C)) que se pueda utilizar de un modo cuantificable y controlable, por ejemplo, cada dos días o incluso una vez a la semana, para sensibilizar el sistema inmunitario innato y proporcionar protección contra infecciones víricas. La estrategia que se describe a continuación emplea un agente existente, Poli(I:C), de eficacia demostrada pero que no es práctico, y lo convierte en conveniente y efectivo utilizando técnicas de formulación.
- 10 El receptor de tipo Toll 3 (TLR3) es una proteína que en los seres humanos es codificada por el gen *TLR3*. TLR3 es un miembro de la familia de receptores de tipo Toll de los receptores de reconocimiento de patrones del sistema inmunitario innato que desempeña una función fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata. Los TLR están sumamente conservados entre *Drosophila* y los seres humanos, y comparten similitudes estructurales y funcionales. Reconocen patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) que se expresan en agentes infecciosos y media la producción de citocinas necesarias para que se desarrolle una inmunidad efectiva. Los diferentes TLR exhiben patrones de expresión diferentes. Este receptor TLR3 15 también es expresado por las células epiteliales de las vías respiratorias y se limita a la subpoblación dendrítica de los leucocitos.
- 20 TLR3 reconoce ARN bicatenario (ARNbc). El ARN bicatenario es ARN con dos hebras complementarias que se pueden formar durante el ciclo de replicación vírica. Después del reconocimiento, TLR3 induce la activación de factores de transcripción, como NF- κ B y el factor regulador de interferones 3 (IRF3), para incrementar la producción de interferones de tipo I que actúan de señal para que otras células incrementen sus defensas antivíricas.
- 25 La estructura de TLR3 crea una forma de herradura grande que entra en contacto con una herradura vecina para formar un "dímero" de dos herraduras. Gran parte de la superficie de la proteína TLR3 está cubierta por moléculas de azúcar, lo que la convierte en una glicoproteína, pero en una cara (que incluye la interfaz propuesta entre las dos herraduras) hay una gran superficie sin azúcar. Esta superficie también contiene dos zonas diferentes ricas en aminoácidos con carga positiva, que pueden ser un sitio de unión para el ARN bicatenario con carga negativa.
- 30 El ácido poliinosínico-policitidílico (Poli(I:C)) es una molécula de ARN bicatenario con una distribución de PM de hasta 1 000 000 Dalton. El Poli(I:C) es un ligando del receptor de tipo Toll 3 (TLR3) que imita el ARN vírico y es un estimulante conocido de la respuesta inmunitaria innata. Cuando se administra por vía nasal, induce la expresión de proteínas antivíricas como el interferón α y β en el epitelio nasal. Se ha demostrado que reduce el número de infecciones por rinovirus y su intensidad.
- 35 Poli(I:C) es una molécula inestable en soluciones acuosas. En la actualidad, para conseguir un efecto terapéutico o profiláctico efectivo, Poli(I:C) se debe redisolver justo antes de usarlo y se debe administrar cada 2 horas. Para mejorar el cumplimiento de los pacientes y reducir la frecuencia de la dosis, se ha desarrollado una formulación novedosa que es estable y presenta una mayor eficacia.
- 40 Se ha formulado Poli(I:C) con varios polímeros bioadhesivos que pueden prolongar el tiempo de permanencia en el epitelio nasal y proporcionar una estimulación más efectiva y controlable del sistema inmunitario innato.
- 45 La presente invención proporciona la identificación de una formulación única que podría almacenarse prácticamente durante un periodo indefinido a temperatura ambiente y que retiene su actividad estimulante del sistema inmunitario innato.
- 50 Además, la formulación aumenta la eficacia de Poli(I:C) y permite administrar dosis con una frecuencia mucho menor con una actividad estimulante de TLR3 incluso mayor.
- 55 Por lo tanto, la invención se refiere a una composición que consiste en micropartículas, donde las micropartículas consisten en ácido poliinosínico-policitidílico (Poli(I:C)) y un polímero portador de almidón. Las micropartículas son partículas con un tamaño de partícula medio comprendido entre 0.1 μ m y 100 μ m. Preferentemente, el polímero portador es almidón obtenido de maíz, patata o yuca.
- 60 Las microesferas de Poli(I:C)-polímero portador, denominadas también micropartículas, que comprende la composición se producen mediante un proceso de formación de partículas tal como un proceso de secado por atomización.
- 65 La proporción de Poli(I:C)/almidón de acuerdo con la invención está comprendida entre 1/200 (p/p) y 1 / 0.1 (p/p), pero preferentemente entre 1/100 (p/p) y 1/1 (p/p), e incluso más preferentemente entre 1/100 (w/w) y 1/5 (p/p), aunque se prefiere una proporción de Poli(I:C)/almidón comprendida entre 1/12 y 1/9 (p/p).
- El D_v50 (= tamaño inferior acumulativo por debajo del cual están el 50% de las partículas en volumen) de la micropartícula de la composición de acuerdo con la invención está comprendido entre 0.1 micrómetros y 200 micrómetros, preferentemente entre 1 micrómetro y 50 micrómetros, más preferentemente entre 2 micrómetros y 40

micrómetros, incluso más preferentemente entre 2 micrómetros y 20 micrómetros, y aún más preferentemente entre 10 micrómetros y 20 micrómetros.

5 La composición de la invención se puede utilizar en medicina, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones víricas de las vías respiratorias altas tales como las denominadas "resfriados comunes".

La presente composición puede ser utilizada por pacientes que padecen asma y/o EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) con el fin de prevenir y/o tratar potencialmente los síntomas de un resfriado común futuro.

10 Una forma preferida de prevenir y/o tratar las infecciones de las vías respiratorias altas es mediante una administración nasal.

15 La composición de la presente invención, que consiste en micropartículas de ácido poliinosínico-policitidílico (Poli(I:C)) y un polímero portador donde el polímero portador es almidón se puede utilizar para tratar y/o prevenir infecciones (víricas) o el resfriado común, donde la composición se administra mediante aplicación nasal en un intervalo de tiempo comprendido entre un día y un mes, más preferentemente cada dos días o incluso una vez por semana.

20 La composición mencionada anteriormente, en la que la proporción de Poli(I:C)/almidón está comprendida entre 1/200 (p/p) y 1/0.1 (p/p), pero preferentemente entre 1/100 (p/p) y 1/1 (p/p), e incluso más preferentemente entre 1/100 (p/p) y 1/5 (p/p), aunque se prefiere una proporción de Poli(I:C)/almidón comprendida entre 1/12 y 1/9 (p/p), en combinación con un tamaño de micropartícula comprendido entre 0.1 micrómetros y 200 micrómetros, preferentemente entre 1 micrómetro y 50 micrómetros, más preferentemente entre 2 micrómetros y 40 micrómetros, incluso más preferentemente entre 2 micrómetros y 20 micrómetros, y aún más preferentemente entre 10 micrómetros y 20 micrómetros, se puede utilizar para tratar y/o prevenir infecciones (víricas) o el resfriado común, donde dicha composición se administra mediante aplicación nasal en un intervalo de tiempo comprendido entre un día y un mes, más preferentemente cada dos días o incluso una vez por semana.

30 También forma parte de la invención un dispositivo, en particular un sistema de suministro nasal, que comprende una composición de acuerdo con la invención.

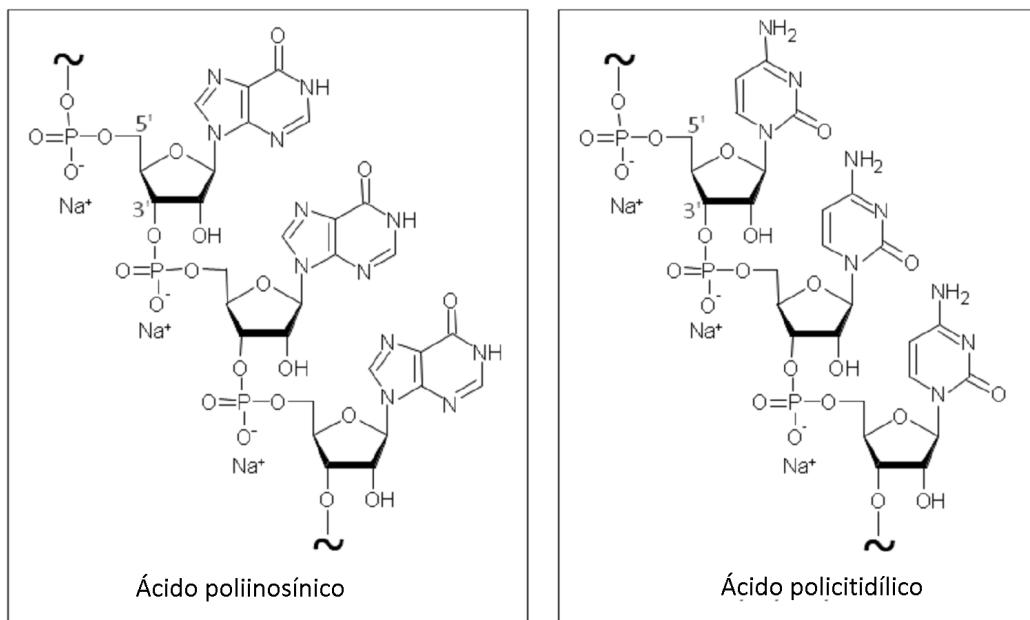
De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, el Poli(I:C) se formula como un polvo seco para administración nasal. Para mejorar la estabilidad, el Poli(I:C) se seca por atomización a partir de una mezcla acuosa que contiene Poli(I:C) y almidón de maíz ceroso secado en tambor (DDWM, por sus siglas en inglés).

35 El almidón se cree que desempeña una doble función: (1) actúa como bioadhesivo en la nariz, (2) la amilopectina presente en una concentración elevada en el almidón de maíz ceroso se descompone por acción de las amilasas en la nariz para liberar Poli(I:C).

40 La administración nasal se realiza preferentemente utilizando un dispositivo de polvo nasal monodosis (dispositivo de dosis unitaria suministrado por Aptar Pharma Alemania). El dispositivo de dosis unitaria es un sistema de suministro activo, lo cual quiere decir que el paciente no necesita inhalar y su rendimiento es independiente del paciente. La dosis se administra por pulsación, que se controla por sobrepresión. La dosis por descarga se determina por la concentración de Poli(I:C) en el polvo seco por atomización y el peso emitido del polvo. El polvo se administrará en cada fosa nasal utilizando un dispositivo nuevo para cada descarga.

45 Como se ha mencionado anteriormente, Poli(I:C) es un ARN bicatenario sintético constituido por hebras polinucleotídicas antiparalelas de sales sódicas del ácido inosínico y ácido citidílico. Las hebras están unidas de forma no covalente mediante puentes de hidrógeno formados entre las bases inosina y citosina.

50 La longitud media de la cadena para el Poli(I:C) está comprendida entre 300 y 6000 pares de bases, lo cual corresponde aproximadamente a entre 180 000 y 3 600 000 Dalton. La fórmula molecular es $(C_{10}H_{10}N_4NaO_7P)_x \cdot (C_9H_{11}NaN_3O_7P)_x$.



El Poli(I:C) anterior se puede adquirir de proveedores comerciales, pero también se puede sintetizar opcionalmente en el laboratorio utilizando, por ejemplo, el siguiente procedimiento.

- 5 El producto híbrido Poli(I:C) se fabrica a partir de los homopolímeros poliinosina (I) y policitidina (C) individuales. La Polil y la PoliC se sintetizan mediante la polimerización individual de los difosfatos de los nucleósidos inosina y citidina en presencia de polinucleótido-fosforilasa (PNPasa). Cada difosfato de nucleósido es polimerizado de forma individual por la PNPasa durante 20–24 h para controlar la longitud del polímero correspondiente al ácido ribonucleótido resultante. A continuación se añade la enzima, una proteína cinasa, para detener la reacción de polimerización. Los homopolímeros resultantes (es decir, moléculas de ARN monocatenarias) se hidrolizan para controlar que el rango de peso molecular de cada producto polimérico esté comprendido dentro de un rango específico. El producto hidrolizado se trata con etanol para que precipiten las moléculas de ARN monocatenarias (ARNmc) en la solución. El precipitado se separa del sobrenadante y se disuelve en agua. A continuación, la solución de ARNmc se filtra para eliminar el material particulado, se ultrafiltra para eliminar los contaminantes de peso molecular bajo y después se liofiliza. Los ARNmc liofilizados obtenidos como productos se evalúan por separado para determinar su pureza, peso molecular y otros atributos de calidad para garantizar que los productos cumplen las especificaciones.
- 10 20 Los homopolímeros monocatenarios individuales (Polil y PoliC) se disuelven por separado en cloruro sódico 0.015 M y después se combinan para aparear las hebras formando el producto híbrido bicatenario (Polil: PoliC). Después de mezclar, la solución resultante se filtra. El filtrado se ultrafiltra para eliminar los contaminantes de peso molecular bajo. A continuación, se liofiliza el producto ultrafiltrado. El producto híbrido resultante se almacena a -20 °C. El ARNbc liofilizado obtenido como producto se evalúa para determinar su pureza, peso molecular y otros atributos de calidad para garantizar que el producto cumpla las especificaciones.
- 15 25

Materiales y métodos

- 30 Sal sódica del ácido poliinosínico-policitidílico (Poli(I:C)), Midland Certified Reagent Company Inc (Texas, EE. UU.), lote 020905; almidón de maíz parcialmente pregelatinizado, Stada AG (Bad Vilbel, Alemania), lote 93301-9628; carboximetilcelulosa sódica (Blanosa 7MF), Ashland Aqualon (Wilmington, DE, EE. UU.), lote 3-30172; dipalmitoilfosfatidilcolina (Lipoid PC 16:0/16:0), Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemania), lote 563098-01/049; lactosa monohidratada (#316 Fast Flo), Foremost (Banaboo, WI, EE. UU.), lote 8509052261; alginato de sodio (Protanal LF10/60LS), FMC Biopolymer (Drammen, Noruega), lote S19616; etanol absoluto Chem-Lab (Zedelgem, Bélgica), lote 17.2712904.400.

Actividad biológica *in vitro* de Poli(I:C)

- 35 40 Se infectaron células A549 sensibles a Poli(I:C) (células epiteliales alveolares carcinómicas humanas) con un vector que contenía el promotor de IFN-β1 largo (cromosoma 9 desde la posición 21069463 a la 21067869), acoplado a un constructo de proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) y luciferasa de *Renilla* (constructo B1L-GAR5). Tras la estimulación con Poli(I:C), se activa la vía de IFN, lo cual produce la activación del constructo indicador B1L-GAR5 y la expresión de los genes indicadores de luciferasa y GFP. Para obtener un clon celular muy sensible, se separaron las células estimuladas con Poli(I:C) con una alta expresión de GFP utilizando un citómetro

de flujo FACS Aria (Becton Dickinson) y, de entre más de 200 clones, se seleccionó el clon H10 en función del % de células sensibles a Poli(I:C). Se cultivaron células A549-B1L-GAR5-H10 hasta que las células de los frascos de cultivo tisular confluyeron, después de lo cual se renovó el medio y las células se cultivaron durante 4 días más. A continuación, las células se recolectaron utilizando tripsinización estándar, se realizó un recuento y se colocaron en placas de fondo plano de 96 pocillos con una densidad de 50 000 células por pocillo, y se estimularon durante la noche con interferón β (75U/mL) en 100 μ L. Al día siguiente, se añadieron 100 μ L de mezclas de Poli(I:C)-polímero portador a las células en una proporción de Poli(I:C):polímero= 1:5, lo cual dio como resultado un volumen final de 200 μ L, y las células se incubaron durante 24 h más. Después de la incubación, se recolectaron las células (mediante desprendimiento mediado por tripsina) y se analizaron en un citómetro de flujo BD-Calibur.

10 Secado por atomización de Poli(I:C) con polímeros portadores

El proceso de secado por atomización del alginato, CMC (blanosa) y almidón de maíz parcialmente pregelatinizado se llevó a cabo en un nanoatomizador B90 y en un miniatomizador B290 de Büchi (Büchi, Flawil, Suiza). En general, los experimentos de secado por atomización con el nanoatomizador B90 dieron como resultado unos rendimientos bajos debido a la alta viscosidad de las soluciones. Se filtró agua desmineralizada utilizando un filtro de acetato de celulosa de 0.2 micrones (Whatman FP30/0.2 CA-S) y se introdujo en un vaso de precipitados. Los excipientes se añadieron mientras se agitaba con un agitador magnético. Cuando se disolvieron completamente, se añadió Poli(I:C) a la solución. Se aplicaron una concentración de sólidos total de un 0.5% (p/p) y una proporción de Poli(I:C)/excipiente de 1/9 (p/p) para todos los conceptos. Las composiciones de las soluciones de alimentación se enumeran en la Tabla 1A.

Tabla 1A: Composiciones de alimentación de los conceptos de alginato, CMC y almidón de maíz parcialmente pregelatinizado

Material	Cantidad (g)		
	alginato	CMC	almidón de maíz parcialmente pregelatinizado
(Referencia) Alginato sódico (Protanal LF 10/60LS)	1.35		
(Referencia) CMC sódica (Blanosa 7 MF)		1.35	
DDWM			1.35
Poli(I:C)	0.15	0.15	0.15
Agua desmin.	300	300	300

25 (Referencia) Para el concepto de DPPC-Poli(I:C), se determinó la solubilidad de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) en mezclas diferentes de etanol/agua. Cuando se secó por atomización DPPC pura, el rendimiento obtenido fue de tan solo un 25%. Por lo tanto, se contempló la adición de un material portador. Debido a la precipitación de CMC sódica, alginato sódico, almidón de maíz ceroso y maltodextrina al añadir etanol, se seleccionó la lactosa como portador para secar por atomización el Poli(I:C) con DPPC. Se filtró agua desmineralizada utilizando un filtro de acetato de celulosa de 0.2 micrones (Whatman FP30/0.2 CA-S) y se introdujo en un vaso de precipitados. Se añadió lactosa mientras se agitaba con un agitador magnético. Una vez disuelta, se mezclaron ambas soluciones y se calentaron hasta 60 °C. Cuando se disolvieron completamente, la solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió Poli(I:C). Se aplicaron una concentración de sólidos total de un 0.28% (p/p) y una proporción de Poli(I:C)/lactosa/DPPC de 1/2.25/6.75 (p/p/p). La composición de la solución de alimentación se enumera en la Tabla 1B.

Tabla 1B: Composiciones de alimentación del concepto de DPPC (Referencia)

Material	Cantidad (g)
DPPC	
DPPC (Lipoid PC 16:0/16:0)	1.35
Etanol absoluto	430.80
Lactosa monohidratada (#316 Fast Flo)	0.45
Poli(I:C)	0.20
Agua desmin.	287.20

40 El secado por atomización de estas soluciones se llevó a cabo en un atomizador a escala de laboratorio, bucle inerte de tipo B 290 (Büchi, Flawil, Suiza). Las soluciones se alimentaron a una boquilla de dos fluidos (diámetro: 0.7 mm) en la parte de arriba del atomizador utilizando una bomba peristáltica de tipo 520U (Watson Marlow, Cornualles, RU). El atomizador operó en un modo de flujo de nitrógeno paralelo. Las partículas atomizadas se recolectaron en un depósito acoplado a un ciclón. Tras recolectar las partículas, el ciclón se enfrió hasta temperatura ambiente. El polvo recolectado se transfirió a viales de vidrio de color ámbar en una cámara de seguridad biológica. Los viales se

purgaron con nitrógeno, se sellaron y se almacenaron a 5 °C. Los parámetros del proceso se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones del proceso (alginato, CMC y DPPC son compuestos de referencia)

Parámetros del proceso	Valor diana			
	alginato	CMC	almidón de maíz parcialmente pregelatinizado	DPPC
Temperatura del nitrógeno de secado entrante (°C)	150	150	150	100
Temperatura del nitrógeno de secado saliente (°C)	70	70	70	50
Tasa de alimentación (g/min)	4.0	4.1	4.0	5.3
Temperatura del condensador (°C)	NC	NC	NC	10
Aspirador del nitrógeno de secado (%)	100	100	100	100
Caída de presión del nitrógeno de atomización (bar)	0.3	0.3	0.3	0.3
Concentración de oxígeno (%)	<6	<6	<6	<6

5 Secado por atomización de conceptos adicionales de Poli(I:C)-almidón de maíz parcialmente pregelatinizado

El proceso de secado por atomización se llevó a cabo en un miniatomizador B290 de Büchi (Büchi, Flawil, Suiza). Se introdujo agua exenta de nucleasas en un vaso de precipitados y se añadió el almidón de maíz parcialmente pregelatinizado mientras se mezclaba con un Ultra Turax T25 (Janke & Kunkel), hasta que el almidón se dispersó completamente. Se disolvió Poli(I:C) en agua exenta de nucleasas y se agitó con un agitador magnético hasta que Poli(I:C) se disolvió completamente. Se añadió Poli(I:C) disuelto al almidón dispersado y se agitó a temperatura ambiente. La solución de Poli(I:C) se preparó justo antes del secado por atomización. Se aplicaron una concentración de sólidos total de un 10% (p/p) o un 0.45% y una proporción de Poli(I:C)/almidón de 1/200 – 1/100 – 1/50 – 1/24 - 1/9 (p/p). Las composiciones de alimentación de estas formulaciones se muestran en la Tabla 3A.

10 Tabla 3A: Composiciones de alimentación de los conceptos de almidón de maíz parcialmente pregelatinizado:

Material	Cantidad (g)					
	1/200	1/100	1/50	1/24	1/9	1/9
	10%	10%	10%	10%	10%	0.45%
Almidón de maíz parcialmente pregelatinizado (g)	50.25	25.25	25.5	12.5	9	4.5
Poli(I:C) (g)	0.25	0.25	0.500	0.500	1	0.5
Agua exenta de nucleasas (g)	454.5	229.5	234	117	90	1106

20 Las soluciones se alimentaron a una boquilla de dos fluidos (diámetro: 0.7 mm) en la parte de arriba del atomizador utilizando una bomba peristáltica. El atomizador operó en un modo de flujo de nitrógeno paralelo. Las partículas atomizadas se recolectaron en un depósito acoplado a un ciclón. Tras recolectar las partículas, el cilindro de vidrio y el ciclón se enfriaron hasta temperatura ambiente. El polvo recolectado se transfirió a una botella de vidrio ámbar y esta botella se introdujo en una bolsa de aluminio con cierre hermético. Los viales se almacenaron a temperatura ambiente. Los parámetros del proceso se enumeran en la Tabla 3B.

25 Tabla 3B: Condiciones del proceso

Parámetros del proceso	200/1 – 100/1 – 50/1 – 24/1 – 9/1 10% p/p	9/1 0.45% p/p
Temperatura del nitrógeno de secado entrante (°C)	180	150
Temperatura del nitrógeno de secado saliente (°C)	95-112	75-95
Tasa de alimentación (g/min)	6-9	5-6
Temperatura del condensador (°C)	10	10
Aspirador del nitrógeno de secado (%)	100	100
Caída de presión del nitrógeno de atomización (bar)	0.3	0.4
Concentración de oxígeno (%)	<6	<6

30 Microscopía electrónica de barrido

Se rociaron partículas de oro con un diámetro de +/- 30-50 nm sobre las muestras. Se generaron imágenes utilizando un microscopio electrónico de barrido FEI de tipo Quanta 200F con un detector de Everhart Thornley.

Contenido de agua- valoración de Karl Fischer

El contenido de agua de los conceptos se determinó mediante una valoración de Karl Fischer volumétrica directa. Se utilizó un valorador A KF V30 (Mettler Toledo, EE. UU.). El polvo (50-100 mg) se transfirió al recipiente de valoración que contenía metanol anhídrico Hydralan® (Sigma Aldrich) y se agitó durante 300 segundos. La valoración se realizó con Composite 2 Hydralan® (Sigma Aldrich) en una concentración de 2 mg/mL utilizando una bureta de 5 mL. Para finalizar, se aplicó una deriva de parada (*stop drift*) de 15 µg/min. Las muestras se analizaron por triplicado.

Determinación del tamaño de partícula

Existe una tendencia a evaluar los datos de la distribución del tamaño de partícula meramente en función de la distribución del volumen de los productos de interés. Por lo tanto, es habitual limitar la evaluación a una comparación de los tamaños inferiores acumulativos D_{v10} , D_{v50} y D_{v90} .

Sin embargo, la comparación de los tamaños inferiores acumulativos D_{vX} puede no ser siempre directa debido al hecho de que las técnicas e instrumentos diferentes proporcionan fácilmente resultados diferentes.

Además, se puede obtener más información a partir de los datos de la distribución del tamaño (o la forma) de partícula analizándolos desde una perspectiva diferente (es decir, utilizando otros parámetros).

Para determinar la distribución del tamaño de partícula se utilizó el método de ensayo de difracción por rayos láser.

El análisis se llevó a cabo en un difractómetro de rayos láser Mastersizer 200 de Malvern equipado con un módulo de dispersión en vía húmeda Hydro2000S (o un sistema equivalente). El instrumento se utiliza en el modo de detección ON de luz azul con un rango de tamaño comprendido entre 20 nm y 2 mm.

Pruebas *in vivo* de formulaciones en el modelo de la gripe en ratones

Todos los estudios en animales fueron autorizados por el comité de ética y se realizaron de acuerdo con las normas nacionales e internacionales. Se utilizaron ratones Swiss (Janvier) hembra de 8-12 semanas. Todos los tratamientos intranasales se realizaron con anestesia de isoflurano. Para administrar una cantidad de líquido, se aplicó una gota justo encima de la fosa nasal y, cerrando la boca, se dejó que la gota entrara a través de la fosa nasal al interior de la cavidad nasal. Se prepararon polvos de Poli(I:C)-portador secado por atomización justo antes de cada experimento y se administraron en 15 µL de líquido. Se administró Poli(I:C) sin formular en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una concentración de 1 mg/mL. El pretratamiento se realizó normalmente el día 2 o 3 antes de la exposición. Los ratones se expusieron el día 0 a 10 x DL_{90} de H1N1 PR adaptado para ratones (GRIPE PR 1600517) en 25 µL (exposición de volumen alto) o a 1x DL_{90} en 15 µL (exposición de volumen bajo). Despues de la exposición, los ratones se monitorizaron a diario durante 14 días midiendo su peso y comportamiento, los ratones se sacrificaron cuando había adelgazado más de un 20% en comparación con el día de la exposición o cuando su comportamiento mostró signos pronunciados de enfermedad.

Resultados

Selección de polímeros portadores

Un requisito de un concepto exitoso para la prevención de los resfriados comunes nasales es que la actividad biológica de Poli(I:C) se debe preservar en la formulación final. Por lo tanto, un primer paso en la selección de polímeros portadores para el proceso de secado por atomización fue identificar polímeros que no inhibieran la capacidad estimulante de interferones de Poli(I:C). Con este fin, se mezclaron varios polímeros portadores con Poli(I:C) en una proporción de 5:1 (p:p) y se añadieron en cantidades valoradas a una línea celular con promotor de interferón-indicador-GFP sensible a Poli(I:C) (clón H10, A549-IFN-GAR5) (remítase a la sección de los Materiales y métodos para obtener más información). Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C y un 5% de CO₂, después de lo cual se midió el porcentaje de células GFP⁺ en un citómetro de flujo. Unas concentraciones mayores de Poli(I:C) dieron como resultado un porcentaje mayor de células GFP⁺, lo cual no permitió utilizar este modelo *in vitro* para evaluar la actividad biológica de mezclas de Poli(I:C)-portador (Figura 1). De los diferentes portadores evaluados, el alginato sódico, almidón de maíz parcialmente pregelatinizado, DPPC y blanosa no inhibieron la capacidad estimulante de interferones de Poli(I:C). En cambio, el carbopol, κ-carragenano, quitosano y polietilamina inhibieron o bloquearon por completo la capacidad estimulante de interferones de Poli(I:C). Sobre la base de estos resultados, se seleccionaron los portadores que no afectan a Poli(I:C): alginato sódico (Protanal LF10/60LS, FMC Biopolymer), almidón de maíz ceroso secado en tambor (Cargill, via Stada), DPPC (Lipoid PC 16:0/16:0, Lipoid) y CMC sódica (Blanosa 7MF), para el siguiente paso de desarrollo de formulaciones.

El alginato sódico es un polisacárido que forma gel constituido por bloques de ácido manurónico (M) y gulurónico (G). La resistencia y la flexibilidad del gel están definidas por la proporción de G/M. La CMC sódica es un derivado de celulosa con grupos carboximetilo. Se utiliza habitualmente en formulaciones nasales. El almidón de maíz parcialmente pregelatinizado es un almidón basado en amilopectina que no es irritante para el tejido de la mucosa.

Los tres excipientes alginato sódico, CMC sódica y almidón de maíz parcialmente pregelatinizado presentan unas propiedades bioadhesivas buenas. DPPC es un fosfolípido y el constituyente principal de los surfactantes pulmonares. Puede incrementar la absorción nasal.

- 5 **Figura 1: capacidad estimulante (de interferones) biológica de Poli(I:C) y mezclas de Poli(I:C)-portador.** Se incubaron células sensibles a Poli(I:C) con un constructo indicador-GFP expresado bajo el control del promotor de interferón β con mezclas de Poli(I:C)-portador (en una proporción 1:5) durante 24 horas y se analizaron posteriormente para determinar la expresión de GFP. Los números en el eje de las Y indican el porcentaje de células GFP+ de las células vivas totales en la muestra. Los números en el eje de las X indican la concentración de Poli(I:C) en la mezcla. Se muestran resultados representativos de dos experimentos.

Proceso de secado por atomización, y actividad y estabilidad biológica de los conceptos

15 El proceso de secado por atomización se llevó a cabo en un nanoatomizador B90 y en un miniatomizador B290 de Büchi (Büchi, Flawil, Suiza). En general, los experimentos de secado por atomización con el nanoatomizador B90 dieron como resultado unos rendimientos bajos debido a la alta viscosidad de las soluciones.

20 Después de cada proceso, se calculó el rendimiento como la cantidad de polvo recolectado en el depósito dividido entre la cantidad teórica de polvo pesado para preparar la alimentación. Los resultados se enumeran en la Tabla 4. El rendimiento bajo para el Concepto 4 se puede explicar por la observación de que se acumula polvo en el ciclón, lo cual potencialmente provoca adhesividad de DPPC a la temperatura local en el ciclón durante el secado por atomización.

Tabla 4: Rendimiento, peso del polvo recolectado frente al peso teórico

	Concepto			
	Alginato (1) CMC (2)	Almidón de maíz parcialmente pregelatinizado (3)	DPPC (4)	
Rendimiento del proceso (% p/p)	77.7	74.1	86.2	52.0

Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 2 se muestran imágenes de MEB del polvo secado por atomización.

30 El polvo del Concepto 3 (almidón de maíz parcialmente pregelatinizado) consiste en esferas plegadas. Las mediciones de difracción por rayos láser del polvo utilizado como placebo correspondiente dieron como resultado un tamaño de partícula con un D_{v50} de 4.5 micrómetros.

35 Figura 2: Fotografía realizada por un microscopio electrónico de barrido de micropartículas de almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) secado por atomización.

Contenido de agua.

40 Se determinó el contenido de agua del polvo atomizado. El agua residual procede de la captación de agua del entorno y el agua utilizada para el proceso de secado por atomización.

Tabla 5: Contenido de agua de los conceptos después del secado por atomización

	Concepto			
	Alginato (1)	CMC (2)	Almidón de maíz parcialmente pregelatinizado (3)	DPPC (4)
Contenido de agua (% p/p)	8.2	7.48	7.38	3.61

45 El almidón de maíz parcialmente pregelatinizado, CMC sódica y alginato sódico son excipientes higroscópicos, una característica requerida para la bioadhesión por expansión y formación de gel. Esto se refleja en los resultados enumerados en la Tabla 5. Para el Concepto 4, el contenido de agua resultó ser menor que los de los Conceptos 1-3, muy probablemente porque el Concepto 4 en forma de polvo se secó por atomización a partir de una mezcla de agua/etanol. Además, la lactosa no es higroscópica y la captación de agua se limita debido a la naturaleza lipófila de DPPC en este concepto.

Estabilidad de conceptos de Poli(I:C) a temperatura ambiente

Una característica importante de una formulación contra el resfriado común es que el concepto debe ser estable a temperatura ambiente (TA) para facilitar su almacenamiento y garantizar la actividad el componente activo del producto. Sin embargo, Poli(I:C) es muy inestable cuando se disuelve en disolventes que contienen agua ya que se degrada por hidrólisis o por acción de enzimas RNasa. Se sabe especialmente que las enzimas RNasa están ubicuamente presentes y la contaminación con RNasa podría producir una descomposición rápida de las moléculas de ARN Poli(I:C).

Para evaluar la estabilidad, los cuatro conceptos se almacenaron a temperatura ambiente. Se utilizó Poli(I:C) en PBS almacenado a TA o a -20 °C como controles. Un mes después del almacenamiento, se evaluó la actividad biológica de los conceptos y los controles midiendo la respuesta de interferón-indicador de los conceptos en una línea celular sensible a Poli(I:C). Todos los conceptos de Poli(I:C) secados por atomización mostraron una actividad inalterada en comparación con el Poli(I:C) almacenado a -20 °C en la línea celular sensible a Poli(I:C) (Figura 3). En cambio, el Poli(I:C) almacenado a TA en PBS perdió por completo su actividad estimuladora de interferones. Estos resultados demuestran que las formulaciones secadas por atomización son muy estables cuando se almacenan a temperatura ambiente a diferencia de Poli(I:C) en líquidos que contienen agua.

Figura 3: Estabilidad de los conceptos de Poli(I:C) después de un mes de almacenamiento a temperatura ambiente. Se incubaron células sensibles a Poli(I:C) con un constructo indicador-GFP con mezclas de Poli(I:C)-portador durante 24 horas y se analizaron posteriormente para determinar la expresión de GFP. Los números en el eje de las Y indican el porcentaje de células GFP+ de las células vivas totales en la muestra. Los números en el eje de las X indican la concentración de Poli(I:C) en la mezcla. Se muestran resultados representativos de dos experimentos.

25 Profilaxis *in vivo* utilizando un modelo de exposición a la gripe en ratones

Poli(I:C) se ha descrito en la bibliografía por sus efectos antivíricos. Sin embargo, para que presentara eficacia *in vivo* en un modelo de la gripe en ratones, se tuvo que administrar en días consecutivos o en formulaciones acuosas/liposómicas. En 1972 se demostró que Poli(I:C) era efectivo como tratamiento profiláctico antivírico en un ensayo clínico en seres humanos en el que se expuso a voluntarios al rinovirus humano (RVH) o al virus de la gripe. Sin embargo, en este estudio, Poli(I:C) se tuvo que administrar cada dos horas. Como nuestros conceptos secados por atomización presentaron una actividad biológica *in vitro* similar y una mayor estabilidad a TA en comparación con Poli(I:C) en PBS, realizamos pruebas *in vivo* para evaluar la actividad antivírica de los diferentes conceptos. Con este fin, se trataron ratones con una única dosis intranasal de formulación de Poli(I:C) (secada por atomización) varios días antes de la exposición a la gripe de volumen alto (25 µL) el día 0. Los conceptos secados por atomización se aplicaron utilizando un volumen pequeño (15 µL) de disolventes portadores orgánicos (etanol o 1/1 p/p de etanol/glicerol) para evitar que las partículas se disociasen. Se monitorizaron la pérdida de peso (respecto al día 0), el comportamiento general y la supervivencia durante 14 días (remítase a la sección de los Materiales y métodos para obtener más información). Curiosamente, observamos que un único tratamiento con Poli(I:C) en PBS así como también con almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) secado por atomización en PBS solamente ejercía un efecto profiláctico muy leve frente a la exposición a la gripe tal como indicó una protección no significativa de los ratones en términos de la pérdida de peso y la supervivencia (Tabla 6). Una explicación de esto es que el almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) secado por atomización estaba disuelto en PBS y, por lo tanto, proporcionó una respuesta similar a Poli(I:C). Poli(I:C) en PBS fue ligeramente más efectivo cuando se administró en dos días consecutivos, aunque la diferencia con los ratones de control tratados con placebo no fue significativa. Sorprendentemente, el concepto de almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) en etanol requirió solamente un único tratamiento para conferir una protección significativa frente a la exposición a la gripe, lo cual dio como resultado una supervivencia mayor. Aparentemente, la forma de partículas microesféricas de almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) es una parte crucial del mecanismo de acción que proporciona una mayor protección frente a la gripe.

Tabla 6: Supervivencia de ratones expuestos a la gripe tratados con Poli(I:C) (formulado).

Grupos de tratamiento*	Detalles			
	disolvente	Poli(I:C) total por ratón (µg)	% de ratones supervivientes	valor de P frente al placebo
placebo	PBS	0	0	-
Poli(I:C) día -2	PBS	40	0	N.S.
Poli(I:C) día -2, -1	PBS	80	20	N.S.
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C)	PBS	40	0	N.S.
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C)	etanol	40	60	0.04

* = 5 ratones por grupo, se presentan resultados representativos de dos experimentos, el valor de P se calculó utilizando una prueba estadística del rango logarítmico de Kaplan-Meier. N.S. = no es significativo

En el siguiente experimento, comparamos si el etanol ejercía algún efecto como disolvente portador sobre la intensidad de la exposición a la gripe. En la Tabla 7, se muestra los resultados de los ratones tratados con placebo en PBS frente al etanol. En este experimento, la exposición a la gripe fue un poco menos agresiva en comparación con la exposición utilizada en el experimento de la Tabla 6, lo cual nos permitió observar un efecto positivo o negativo del pretratamiento con etanol sobre la supervivencia después de la exposición a la gripe. Se observó que los ratones tratados con etanol experimentaron una sensibilidad muy similar a la exposición a la gripe en comparación con los ratones tratados con PBS. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que el etanol no contribuye de forma activa al efecto antivírico y, por lo tanto, se puede utilizar como disolvente portador para la administración intranasal que preserva la forma de partículas microesféricas de los conceptos. Cabe destacar que no se puede aplicar Polí(I:C) sin formular en etanol, ya que Polí(I:C) precipitaba en etanol lo cual impedía una aplicación controlada de Polí(I:C).

Tabla 7: Supervivencia de los ratones tratados con placebo en PBS y etanol después de la exposición a la gripe

Grupos de tratamiento*	Detalles			
	disolvente	Polí(I:C) total por ratón (μg)	% de ratones supervivientes	valor de P frente al placebo
placebo	PBS	0	33	-
Placebo en etanol	etanol	0	33	N.S.

* = 6 ratones por grupo, el valor de P se calculó utilizando una prueba estadística del rango logarítmico de Kaplan-Meier. N.S. = no es significativo

En el siguiente paso, abordamos la cuestión de si secar por atomización el concepto para generar partículas de almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Polí(I:C) o simplemente mezclar los ingredientes es necesario/suficiente para observar los efectos antivíricos. Con este fin, mezclamos Polí(I:C) en polvo seco con almidón en polvo seco (Polí(I:C)-almidón mezclado) y comparamos esta mezcla con almidón-Polí(I:C) secado por atomización y placebo. Observamos (Tabla 8) que el almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Polí(I:C) mezclado no ejerció ningún efecto protector significativo frente a la exposición a la gripe, a diferencia de la formulación secada por atomización de almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Polí(I:C) que nuevamente volvió a proporcionar una protección mayor y significativa frente a la exposición a la gripe.

Tabla 8: Supervivencia de ratones tratados con almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Polí(I:C) secado por atomización o mezclado tras la exposición a la gripe

Grupos de tratamiento*	Detalles			
	disolvente	Polí(I:C) total por ratón (μg)	% de ratones supervivientes	valor de P frente al placebo
placebo	PBS	0	0	-
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Polí(I:C) mezclado**	etanol	10	25	N.S.
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Polí(I:C) secado por atomización	etanol	10	60	0.03

* = 6 ratones por grupo, **=4 ratones, el valor de P se calculó utilizando una prueba estadística del rango logarítmico de Kaplan-Meier. N.S. = no es significativo

Para comprobar si las micropartículas secadas por atomización también se podían administrar en otro disolvente orgánico, evaluamos el uso de glicerol como disolvente portador para las micropartículas de Polí(I:C). El uso de este portador también fue posible y proporcionó una protección significativa, sin embargo, la alta viscosidad del glicerol dificultó bastante la aplicación de una gota nasal por vía intranasal. Por lo tanto, evaluamos una mezcla 1/1 de etanol/glicerol para aplicar las micropartículas. En la Tabla 9 se muestran los resultados de este experimento y estos indican claramente que una única administración de las micropartículas en etanol/glicerol da como resultado una mayor supervivencia significativa a la exposición a la gripe en comparación con el placebo (etanol/glicerol solos).

Tabla 9: Supervivencia de ratones tratados con almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Polí(I:C) secado por atomización utilizando etanol/glicerol como disolvente portador

Grupos de tratamiento*	Detalles			
	disolvente	Polí(I:C) total por ratón (μg)	% de ratones supervivientes	valor de P frente al placebo
placebo	etanol/glicerol	0	0	-

Grupos de tratamiento*	Detalles			
	disolvente	Poli(I:C) total por ratón (μg)	% de ratones supervivientes	valor de P frente al placebo
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) secado por atomización	etanol/glice-rol	10	78	<0.01

*= 9 ratones por grupo, el valor de P se calculó utilizando una prueba estadística del rango logarítmico de Kaplan-Meier.

En un paso posterior evaluamos el uso de un polímero portador diferente en la formulación secada por atomización de Poli(I:C). Con este fin, comparamos ratones tratados con placebo con ratones tratados con Poli(I:C) y con almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) secado por atomización o alginato sódico-Poli(I:C) secado por atomización. Observamos que solamente las micropartículas secadas por atomización de Poli(I:C) protegieron los ratones contra una gran pérdida de peso provocada por una exposición subsecuente a la gripe (remítase a la Tabla 10). Poli(I:C) solo no protegió contra la pérdida de peso. Estos resultados indican que se necesita combinar Poli(I:C) con un polímero portador en una micropartícula secada por atomización para conferir suficiente protección contra un patógeno vírico. La naturaleza del polímero portador es menos importante siempre que se preserve la estructura de la micropartícula (remítase a la Tabla 6, el almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) secado por atomización no es efectivo cuando está disuelto en PBS).

Tabla 10: Pérdida de peso de ratones tratados con almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) secado por atomización y alginato sódico-Poli(I:C)

(alginato sódico es un compuesto de referencia)	Detalles				
	Grupos de tratamiento*	disolvente	Poli(I:C) total por ratón (μg)	% de peso retenido el día 4	valor de P frente al placebo
placebo	etanol/glice-rol	0	85.99	-	
Poli(I:C)	PBS	10	87.04	N.S.	
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) secado por atomización	etanol/glice-rol	10	92.82	0.006	
alginato sódico-Poli(I:C) secado por atomización	etanol/glice-rol	10	90.91	0.007	

*= 12 ratones por grupo, el valor de P se calculó utilizando una prueba estadística de la *t* de Student bilateral para datos independientes. N.S. = no es significativo

Por último, comparamos diferentes formulaciones de almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) entre sí y con Poli(I:C) sin formular en PBS con el fin de identificar la concentración de Poli(I:C) requerida en la formulación, así como también el tamaño de micropartícula requerido en la formulación. Con este fin, produjimos además almidón de maíz parcialmente pregelatinizado/Poli(I:C) secado por atomización en una proporción de 50/1, 100/1 y 200/1, así como también almidón de maíz parcialmente pregelatinizado/Poli(I:C) con un tamaño de partícula (D₅₀) de 9 μm (1/9, 0.45%) y (D₅₀) 17 μm (1/9, 10%) respectivamente. Los resultados de la comparación de estas formulaciones con Poli(I:C) sin formular se muestran en la Tabla 11. Observamos que una concentración de Poli(I:C) de entre 1/100 y 1/9 ofrece una buena protección contra la gripe. Diluyendo Poli(I:C) aún más en almidón ofrece una protección menos significativa y menos eficiente. Además, no observamos ninguna diferencia significativa en los dos lotes con un tamaño de partícula diferente, lo cual indica que un tamaño de partícula (D₅₀) de entre 9 μm y 18 μm es suficiente para conferir una protección efectiva con las micropartículas de Poli(I:C).

Tabla 11: Pérdida de peso de ratones expuestos a la gripe tratados con conceptos adicionales de almidón de maíz parcialmente pregelatinizado-Poli(I:C) secado por atomización

Grupos de tratamiento*	Detalles			
	disolvente	Poli(I:C) total por ratón (μg)	% de peso retenido el día 4	valor de P frente a Poli(I:C) (PBS)
Poli(I:C)	PBS	10	82.9	-
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado secado por atomización/Poli(I:C) (50/1)	etanol/glice-rol	10	103.5	<0.02

Grupos de tratamiento*	Detalles			
	disolvente	Poli(I:C) total por ratón (μg)	% de peso retenido el día 4	valor de P frente a Poli(I:C) (PBS)
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado secado por atomización/Poli(I:C) (100/1)	etanol/glice-rol	10	97.2	<0.02
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado secado por atomización/Poli(I:C) (200/1)	etanol/glice-rol	10	90.71	N.S.
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado secado por atomización/Poli(I:C) (9/1, 0.45%)	etanol/glice-rol	10	99.62	<0.02
almidón de maíz parcialmente pregelatinizado secado por atomización/Poli(I:C) (9/1, 10%)	etanol/glice-rol	10	99.56	<0.02

*= 8 ratones por grupo, el valor de P se calculó utilizando una prueba estadística de la *t* de Student bilateral para datos independientes. N.S. = no es significativo

Conclusión

- Se produjeron 4 conceptos en polvo mediante secado por atomización para la administración nasal de Poli(I:C). Se seleccionaron los conceptos con alginato sódico (Concepto de referencia 1), CMC sódica (Concepto de referencia 2), almidón de maíz parcialmente pregelatinizado (Concepto 3) y DPPC (Concepto de referencia 4) en función de un estudio de su bioactividad y capacidad de proceso. Todos los cuatro conceptos se evaluaron *in vitro* para determinar la actividad biológica y estabilidad de Poli(I:C) en la formulación. Nuestros resultados indican que el proceso de secado por atomización no ejerció ningún efecto negativo sobre la bioactividad de Poli(I:C). Además, las formulaciones son estables a temperatura ambiente a diferencia de Poli(I:C) disuelto en PBS.
- En un paso posterior evaluamos los Conceptos 1 y 3 en la profilaxis de la gripe utilizando un modelo murino de exposición a la gripe. Basándonos en la bibliografía, comenzamos los experimentos con la expectativa de que los Conceptos 1 y 3 debían ejercer un efecto protector similar a Poli(I:C) sin formular (en PBS). Sorprendentemente, se descubrió que los Conceptos 1 y 3 fueron superiores a Poli(I:C) en la protección de ratones contra una exposición posterior a la gripe. Se descubrió que una única dosis de Poli(I:C) sin formular no es muy eficiente a la hora de proteger ratones, sino que Poli(I:C) se debe administrar varias veces para que sea más efectivo. Sin embargo, una única administración de Poli(I:C) formulado (Conceptos 1 y 3) protegió a los ratones significativamente. Además, se demostró que la estructura de las micropartículas es crucial (ya que las micropartículas disueltas en PBS perdieron actividad *in vivo* (Tabla 6) pero no *in vitro* (Figuras 1 y 2)). Para preservar el tamaño de partícula, administramos las micropartículas en etanol o en los disolventes portadores etanol/glicerol. Los tamaños de partícula (D_v50) comprendidos entre 9 micrómetros y 17 micrómetros fueron efectivos. Poli(I:C) fue efectivo en diluciones comprendidas entre 100/1 y 9/1 (almidón/Poli(I:C)).
- En conclusión, hemos identificado conceptos nuevos que mejoran la eficacia *in vivo* de la administración de una única dosis intranasal de Poli(I:C) para conferir protección profiláctica contra una exposición letal posterior a la gripe.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que consiste en micropartículas, donde las micropartículas consisten en ácido poliinosínico-policitidílico (Poli(I:C)) y un polímero portador de almidón.
5
2. La composición de la reivindicación 1, donde el polímero portador de almidón es un almidón de maíz, almidón de patata o almidón de yuca.
10
3. La composición de la reivindicación 1, donde el polímero portador de almidón es almidón de maíz parcialmente pregelatinizado.
15
4. La composición de cualquier reivindicación anterior, donde las micropartículas se producen mediante un proceso de formación de partículas de secado por atomización.
15
5. La composición de cualquier reivindicación anterior, donde las micropartículas de la composición tienen un D_{v50} de 0.1 μm a 200 μm .
20
6. La composición de la reivindicación 5, donde las micropartículas de la composición tienen un D_{v50} de 1 μm a 50 μm .
20
7. La composición de la reivindicación 6, donde las micropartículas de la composición tienen un D_{v50} de 2 μm a 20 μm .
25
8. La composición de la reivindicación 7, donde las micropartículas de la composición tienen un D_{v50} de 10 μm a 20 μm .
25
9. La composición de cualquier reivindicación anterior, donde la proporción de Poli(I:C) respecto al polímero portador está comprendida entre 1/100 (p/p) y 1/1 (p/p).
30
10. La composición de la reivindicación 9, donde la proporción de Poli(I:C) respecto al polímero portador está comprendida entre 1/12 (p/p) y 1/9 (p/p).
30
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la composición es un polvo seco.
35
12. La composición de cualquier reivindicación anterior, donde la longitud media de la cadena para el Poli(I:C) es de aproximadamente 300 bases a 6000 bases.
35
13. La composición de cualquier reivindicación anterior, donde el peso molecular medio del Poli(I:C) es de aproximadamente 180 kDa a 3600 kDa.
40
14. La composición de cualquier reivindicación anterior, donde la composición es adecuada para administración nasal.
40
15. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso en un método de activación de una respuesta inmunitaria innata antivírica.
45
16. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en medicina.
45
17. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones o del resfriado común.
50
18. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una infección de las vías respiratorias altas mediante la administración nasal de la composición.
55
19. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, donde la composición es para su uso en la profilaxia contra un virus respiratorio o en el tratamiento o la inhibición de una infección vírica de las vías respiratorias.
55
20. La composición para su uso de la reivindicación 19, donde la infección vírica es una infección por el rinovirus humano o una infección por el virus de la gripe.
60
21. La composición para su uso de la reivindicación 19, donde la infección vírica está provocada por un virus seleccionado entre un picornavirus, virus sinticial respiratorio humano, adenovirus, enterovirus y metapneumovirus.
65
22. Un sistema de suministro nasal que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
65

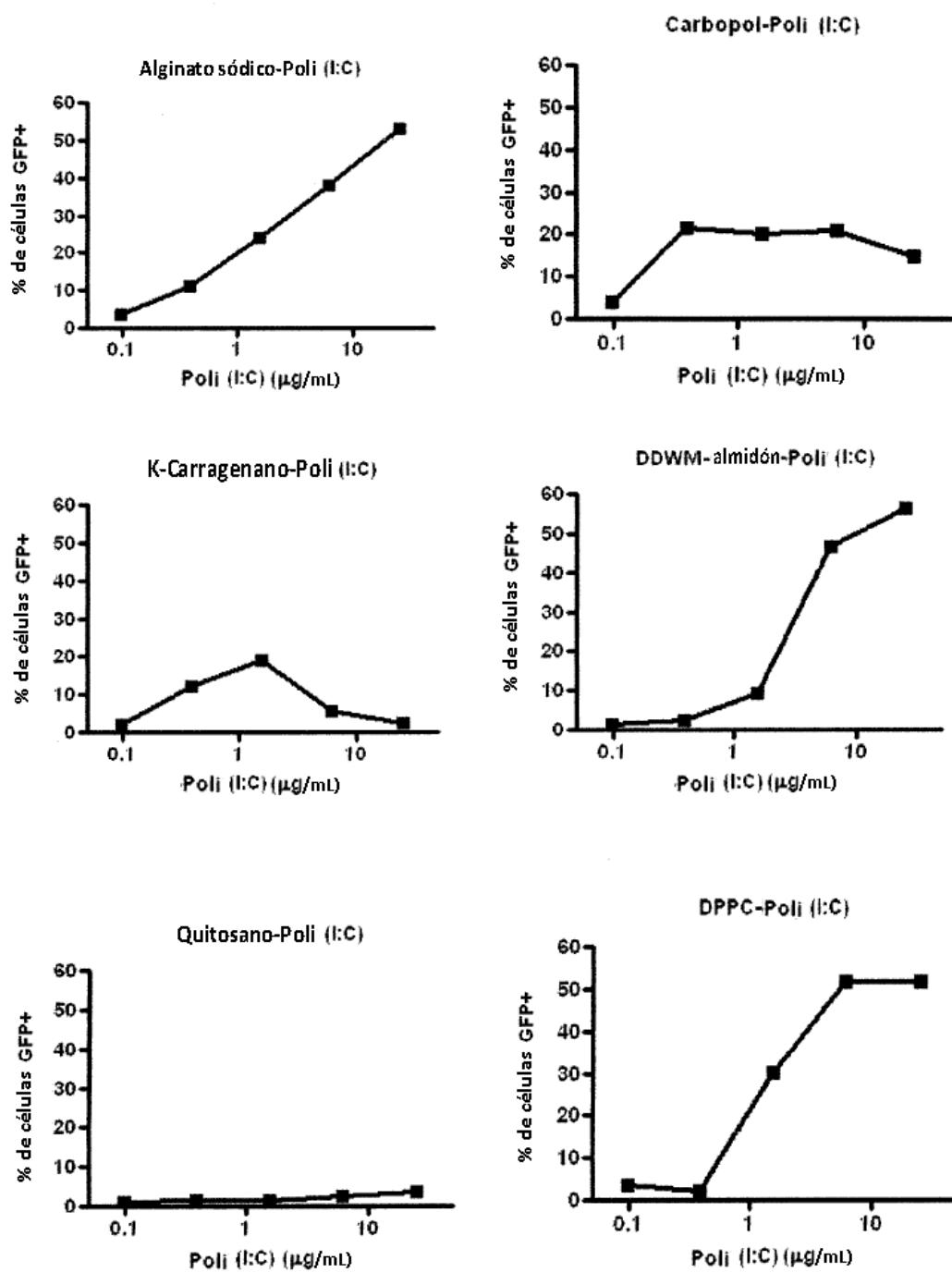


Figura 1

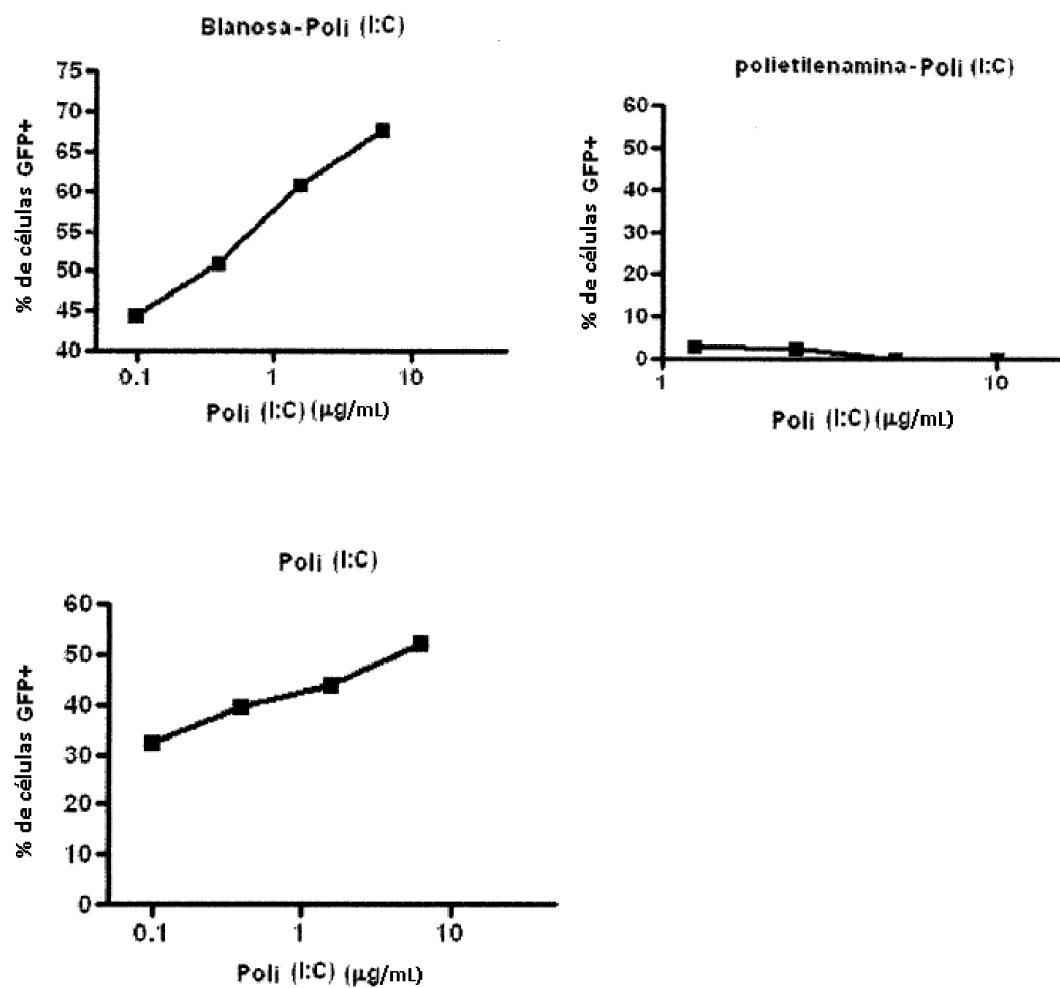


Figura 1 (continuación)

Concepto 3

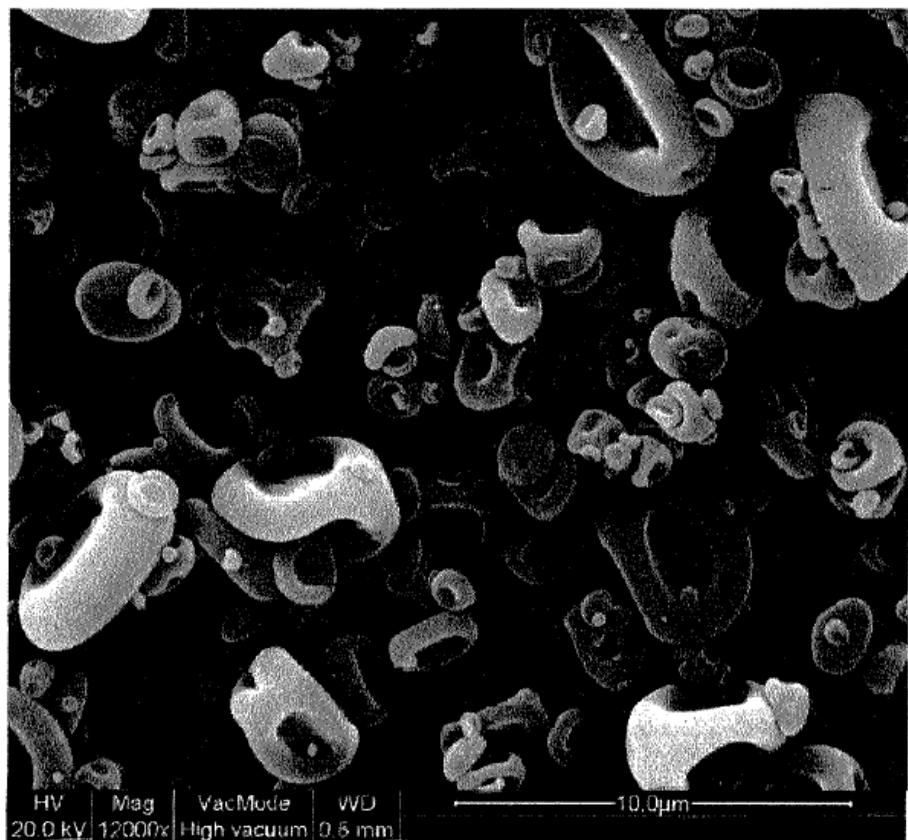


Figura 2

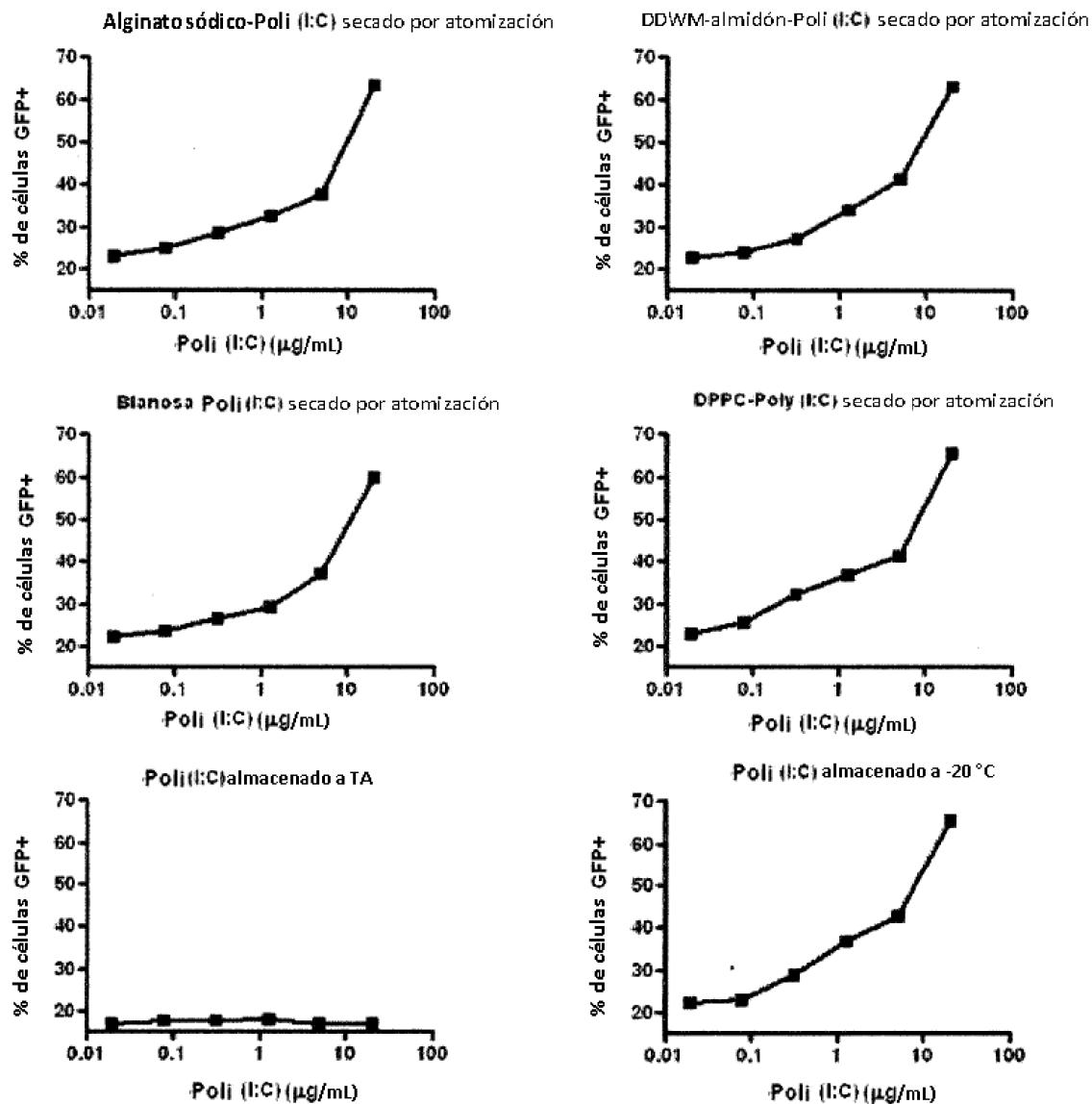


Figura 3