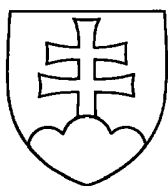


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **8. 11. 1999**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **198 51 282.1**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **6. 11. 1998**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 12. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP99/08557**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/27430**

(11), (21) Číslo dokumentu:

609-2001

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**A61K 39/145,
A61K 39/295,
A61K 9/127,
A61K 39/39,
B05B 11/00,
A61P 11/02**

(71) Prihlasovateľ: **SCHWEIZ. SERUM- & IMPFINSTITUT BERN, Bern, CH;**

(72) Pôvodca: **Glück Reinhard, Spiegel Bern, CH;
Glück Ulrich, Meggen/Luzern, CH;
Collioud André, Gümligen, CH;**

(74) Zástupca: **Hörmann Tomáš, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Prípravky farmaceuticky účinnej látky a dávkovacie zariadenie**

(57) Anotácia:
Je opísaná vakcína vhodná na nazálnu aplikáciu obsahujúca proteíny s influenčným povrchom, mukozálne adjuvans bakteriálneho pôvodu a dávkovacie zariadenie, ktorého konštrukcia zabezpečuje účinnú nazálnu aplikáciu substancie.

SK 609-2001 A3

PRÍPRAVKY FARMACEUTICKY ÚČINNEJ LÁTKY A DÁVKOVACIE ZARIADENIE

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka prípravkov farmaceuticky účinnej látky, obzvlášť antigénov, ktoré sa zmiešajú s mukozálnym adjuvansom a dávkovacím zariadením vytvoreným ako sprejový aplikátor sa môžu nanášať na nosnú sliznicu tak, že je možné docieľiť dosiahnuť nedosiahnuteľnú účinnosť.

Obzvlášť zahrňuje prihláška vakcínu na intranazálnu aplikáciu, pozostávajúcu z:

- a) proteínov s influenčným povrchom, ktoré sú formulované lipozomálne (virozómy),
- b) mukozálneho adjuvans bakteriálneho pôvodu,
- c) špecifického sprejového aplikátora, ktorý je konštruovaný tak, že takmer 100 % sprejovanej dávky môže byť aplikované v celom objeme na nosné sliznice dôležité pre účinnosť.

Doterajší stav techniky

Antigény sú výhodne glykoproteíny s influenčným povrchom, ktoré sú formulované lipozomálne (tak zvané virozómy). Tieto virozómy sa zmiešajú s mukozálnym adjuvans, ktoré je bakteriálneho pôvodu. V ideálnom prípade pochádza z triedy aktívnych alebo inaktívnych toxínov, ako Heat Labile Toxin (HLT), choleratoxín (CT) alebo procholeraenoid (PCG). Nazálny sprejový aplikátor je konštruovaný tak, aby účinná látka mohla byť aplikovaná v podstate v celom objeme na nosnú sliznicu. Formulácia, ktorá je podstatou vynálezu sa

môže používať na rôzne zdravotné indikácie, ako je očkovanie proti chrípke alebo iným infekčným chorobám a rovnako na terapeutické ošetrovanie upchatého nosa, rekonštitúciu poškodenej nosnej sliznice alebo všeobecne mukozálne lokalizované ochorenie.

Rôzni autori opísali imunostimulačný účinok lipozómov (umelých membrán) (Gregoriadis, G.: Immunological adjuvants: A role for liposomes, Immunol. Today 11, (1990) 89-97). Tento imunostimulačný účinok sa dosiahne, ak sa antigény napoja na povrch lipozómu (Glück, R., Mischler, R., Finkel, B., Que, J. U., Scarpa, B., Cryz, S. J. junior: Immunogenicity of new virosome influenza vaccine in the elderly., Lancet 344 (1994), 160-163), uzavru vnútri lipozómu (Gregoriadis, G., Davis, D., Davis, A.: Liposomes as immunological adjuvants. Antigen incorporation Studies, Vaccine 5, (1987) 145-151) alebo sa s lipozómom iba zmiešajú (De Haan, A., Geerligs., H. J., Huckshorn., J. P., Van Schaarenburg., G. J. M., Palache., A. M., 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). Dodatočný imunostimulačný účinok bol pozorovaný, ak sa také lipozómy „prešpikujú“ transmembránovými a fuzogénnymi glykoproteínmi (napríklad influenčné glykoproteíny (Glück, R., Mischler, R., Brantschen., S, Just, M., Althaus, B., Crzy, S.J. junior: Immunopotentiating reconstituted influenza virosome (IRIV) vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. J. Clin. Invest. 90, (1992) 2491-2495) alebo glykoproteín sendai (Gould-Fogerite, S., Mazurkiewicz, J. E., Bhisitkul., D., Mannino, R. J.: The reconstitution of biologically active glycoproteins into large liposomes. Use as a delivery vehicle to animal cells. Zdroj: C. H. Kim, J. Diwan , H. Tedeschi a J. J. Salerno (vydavateľ), Advances in Membrane Biochemistry and Bioenergetics, Plenum Publishing Corp., New York (1987), strana 569.

Dosiaľ však bol tento účinok opísaný najvyššie po parenterálnej aplikácii (i. m., s. c. alebo i. p.). Niektorí autori však objavili, že sa takéto formulácie môžu úspešne podávať obvyklými metódami (kvapkadla alebo

obvyklé nosné spreje). Výsledky sa však vzťahujú takmer výhradne na experimenty s laboratórnymi zvieratami, väčšinou myši, ktoré majú v porovnaní s telesnou hmotnosťou oveľa väčšiu nosnú sliznicu ako porovnateľne človek. Navyše boli podávané množstvá antigénu tak vysoké, že už len z ekonomických dôvodov a rovnako z dôvodov bezpečnosti produktu by použitie pre človeka nepripadalo do úvahy. Rovnako bolo doložené, že sa pri rozumnom dávkovaní antigénu (influenca) cez lipozomálnu formuláciu a správnu nazálnu aplikáciu nemôže dosiahnuť uspokojivý účinok.

Ďalší autori sa preto pokúšali vyvinúť účinnú nazálne aplikovateľnú vakcínu, pričom miesto lipozomálnej formulácie zmiešali antigény s mukozálnym adjuvans bakteriálneho pôvodu. Pritom sa použili obzvlášť HLT, CT alebo netoxické deriváty HLT alebo CT (Elson, C. O., Ealding, W.: Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation, with cholera toxin. J. Immunol. 132 (1984) 2736-2741).

Výsledky v literatúre dokazujú sľubné účinky po nazálnej aplikácii, ktoré boli opakovane dosahované predovšetkým na laboratórnych zvieratách. Avšak i niekoľko málo klinických pokusov na ľuďoch potvrdzuje určitú účinnosť (Tamura, S-J., Ishihira, 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. Opakovane však bolo použité množstvo antigénu a adjuvans veľmi vysoké, čo opäť otvára otázku výhrad k bezpečnosti produktu a možnosti komerčného použitia.

Ďalšou nevýhodou dosiaľ opísaných pokusov o vývoj nazálne aplikovateľnej, preventívnej alebo terapeuticky účinnej vakcíny sú nedostatočné aplikačné systémy, ktoré sú dnes k dispozícii.

V súčasnej dobe existujú nosné spreje ako mono-, bi- a multidávkovacie aplikátory. Z podrobných zisťovaní a skúšok doterajších nosných sprejov pomocou aplikácie farebných látok (metylénová modrá) a nosnej endoskopie vyplýva, že nastrekovaná substancia (vakcína, farmaceutický roztok) dospeje na sliznicu mukozo-asociovaného imúnneho systému turbináliou najvyššie 25

%.

Sliznica mukozo-asociovaného imúnneho systému sa nachádza v nosnej dutine na laterálnej nosnej stene v oblasti turbinálií (nosnej mušle), ako napríklad ukazuje obrázok 1, ľudské turbinálie a turbinálie srny. Z našich zisťovaní vyplýva, že s doterajšími nosnými sprejmi v dôsledku značných strát v nosnej predsieni (vestibulum nasi) (pozri obrázok 2) a rovnako na stene nosnej priehradky dospeje do hlavnej nosnej dutiny len nedostatočné množstvo farmaceuticky aktívnej látky. Tieto nosné štruktúry sú vystlané imunologicky inaktívnym doštičkovým epitelom a lojovými žľazami (Walter Becker, Hans Heinz Naumann, Carl Rudolf Pfaltz: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1992).

Príčiny nemožnosti doterajších nosných aplikátorov, nastriekať účinnú dávku na respiračnú sliznicu (miesto špecifickej a nešpecifickej obrany) sú rozdielneho druhu:

- 1) na základe nedostatočných znalostí anatómie je hlavný vektor rozprašovacieho lúča pri aplikácii sprejom nasmerovaný do zlého smeru. Pritom sa farmaceuticky aktívna látka prakticky nedostane do hlavnej nosnej dutiny. Nastriekaná kvapalina čiastočne vyteká cez hornú peru smerom dole.
- 2) Rozprašovací nástavec v nosnej časti nemá priemer prispôsobený anatomickým pomerom. Vnútorňý nosný otvor má prirodzene tvar štrbiny a má funkciu dýzy (pozri obrázok 2). Nosné časti s obvyklou šírkou neumožňujú prekonávanie tohto anatomického zúženia. Pri nastrekovaní pred Lumen nasi dospeje do hlavnej nosnej dutiny len taký sektor postrekovacieho kužela, ktorý zodpovedá šírke Lumen nasi.
- 3) Optimálny uhol nástreku dosiaľ nebol vedecky doložený. U obvyklých sprejových aplikátoroch kolíše medzi 30 a 80° k horizontále pri normálnej polohe hlavy prípadne ku kolmici k pozdĺžnej osi tela človeka. Tým sa rovnako vysvetľujú značné straty, totiž až 90 % aplikovaného objemu. Naše systematické výskumy ukazujú, že optimálny uhol nástreku leží

medzi 50 a 80°.

- 4) Obvyklé nosné spreje majú príliš krátku nosnú časť. Vzdialenosť medzi manžetou pre prst a striekacím otvorom je príliš krátka. S doterajšími sprejmi nie je vôbec možné dospieť až do vnútorného nosného otvoru. Nosná časť by mala byť najmenej o 0,7 cm dlhšia, obzvlášť výhodne má nosná časť dĺžku 1 až 1,5 cm.

Preto je úlohou predloženého vynálezu dať k dispozícii zlepšený prípravok farmaceuticky účinnej látky a rovnako zlepšené podávacie zariadenie na prevenciu a ošetrovanie infekčných ochorení. Táto úloha sa rieši znakmi podľa patentových nárokov:

Podstata vynálezu

Najúčinnejší prípravok na preventívny a terapeutický účinok pozostáva z formulácie prekvapivo kostimulujúceho efektu lipozómov, zmiešaných s mukozálnym adjuvans a aplikované novým dávkovacím zariadením prípadne novým nosným sprejom.

Podľa toho pozostáva komplex vynálezu z nasledujúcich komponentov:

- a) aktívna substancia (antigén),
- b) vyvážené zmesi lipozómov a mukozálnych adjuvans a
- c) nového zdravotníckeho prístroja, totiž špecifického dávkovacieho zariadenia, prípadne nosného spreja.

Obzvlášť sa vynález týka vakcíny na intranazálnu aplikáciu, pozostávajúcu z:

- a) proteínov s influenčným povrchom, ktoré sú formulované lipozomálne (virozómy),
- b) mukozálnych adjuvans bakteriálneho pôvodu a
- c) špecifického sprejového aplikátora, ktorý je konštruovaný tak, že takmer 100 % sprejovej dávky sa môže aplikovať v celom objeme na nosné

sliznice, dôležité pre účinnosť.

Aktívna látka sa preto vzťahuje na antigény, obzvlášť na influenčné glykoproteíny, ktoré sa pre ich transdoménovú membránu môžu ľahko vstavať do umelej membrány (lipozómov). Na povrchu lipozómov sa však môžu ľahko spájať ešte ďalšie antigény samé alebo v kombinácii s influenčnými antigénmi. Spojenie sa podľa chemických vlastností antigénov uskutočňuje spontánne alebo pomocou chemických molekúl kroslinkerov, ktoré boli už skôr opísané (Martin, F.J., Papahadiopoulos, D.: Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles, J. Bio. Chem. 257, (1982) 286-288). Môže tiež ísť o DNS-plazmid alebo RNS-plazmid, ktorý je kódovaný pre antigén a môže byť uzavretý do lipozómu.

Pojem „antigén“ v zmysle tohto vynálezu zahŕňa ako úplné molekuly tak i fragmenty týchto molekúl, ktoré majú antigénne vlastnosti a/alebo sa môžu použiť na imunizáciu. Ďalej zahŕňa pojem antigén molekuly a/alebo fragmenty molekúl, ktoré sú imunostimulačné.

Proteín s influenčným povrchom použitý vo vakcínach podľa vynálezu zahŕňa výhodne hemaglutinín (HA). Ďalej môže proteín s influenčným povrchom obsahovať hemaglutinín (HA) v spojení/kombinácii s neuraminidázou (NA).

V jednej výhodnej forme uskutočnenia sa vynález týka vakcíny, ktorá obsahuje ďalšie antigény. Obzvlášť môžu byť ďalšie antigény viazané na povrch virozómov.

V jednej ďalšej výhodnej forme uskutočnenia sa týka prihláška vakcíny podľa vynálezu, ktorá okrem antigénov pozostávajúcich z proteínu (proteínov) s influenčným povrchom obsahuje ďalšie antigény, výhodne z patogénnych organizmov. Pritom tu môže byť patogénnym organizmom vírus, baktéria, huba alebo parazit. Tieto organizmy obsahujú zárodky rôznych ochorení ako napríklad vírus hepatitídy A, vírus hepatitídy B, vírus respiračný Syncytial, (pneumovírus), parainfluenzavírus, vírus príušníc, vírus morbilli, HIV, baktérie diftérie, (*Corynebacterium diphtheriae*), tetanový bacil (*Clostridium tetani*),

pneumokoky, *Haemophilus influenzae*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Aspergillus-arten*, druhy *Trichomonas*, druhy *Trypanosoma*, druhy *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, druhy *Trematoden* a *Nematoden*. Obzvlášť obsahujú druhy *Trematoden Schistoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum* a druhy *Nematoden Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* a *Trichinella spiralis*.

Ďalej zahrňuje vynález vakcínu, ktorá je influenčná vakcínou. Obzvlášť zahrňuje vynález vakcínu, ktorá sa môže použiť na prevenciu a/alebo ošetrovanie všeobecných infekcií/infekčných ochorení. Ďalej slúži vakcína na prevenciu a/alebo ošetrovanie influenčných ochorení, na prevenciu a/alebo ošetrovanie upchatého nosa, na ošetrovanie zranenia povrchu nosných slizníc. Ďalej zahrňuje vynález výhodnej vakcínu, pričom obsah hemagglutínínu na dávku (100 µl) leží medzi 1 - 30 µg, výhodne medzi 3 - 10 µg a najlepšie 3,75 µg.

V jednej výhodnej forme uskutočnenia poukazuje vynález na vakcínu, pričom pomer lipozómy fosfolipid k HA leží medzi 1 : 10 a 20 : 1, výhodne medzi 1 : 1 až 10 : 1 a obzvlášť výhodne 3 : 1.

Podľa toho sa vynález výhodne vzťahuje na vakcínu, pričom fosfolipid lipozómu sa vyberie zo skupiny neutrálnych, kationových a/alebo aniónových fosfolipidov.

V jednej výhodnej forme uskutočnenia sa vynález vzťahuje na vakcínu, pri ktorej je mukozálny adjuvans aktívny toxín, inaktívny toxín a/alebo netoxický toxín. Obzvlášť obsahuje mukozálny adjuvans, výhodne *Heat Labile Toxin (HTL)*, cholera toxín (CT) a/alebo Procholeragenoid (PCG). V jednej ďalšej výhodnej forme uskutočnenia je mukozálny adjuvans *Heat Labile Toxin (HTL)* od *Escherichia Coli*. V jednej ďalšej výhodnej forme uskutočnenia môžu byť toxíny inaktivované. Táto inaktivácia sa môže uskutočňovať rekombinačnými technológiami.

V jednej ďalšej forme uskutočnenia zahrňuje vynález vakcínu, ktorá

obsahuje *Heat Labile Toxin (THL)* a/alebo choleratoxín (CT) v pomere, ktorý leží medzi 1 : 2 až 20 : 1, lepšie medzi 1 : 1 až 1 : 10 a najlepšie 7,5 : 1.

Vyššie použitý pojem „vyvážená zmes lipozómov a mukozálnych adjuvans“ sa vzťahuje na jednej strane na správny pomer antigénov a fosfolipidov a rovnako mukozálny adjuvans, ktoré sú nutné na uspokojivú účinnosť. Klinické zisťovania ukázali nasledujúce: ideálny pomer fosfolipidu (napríklad fosfatidylcholín, fosfatidyletanolamín, neutrálny, aniónové alebo kationové fosfolipidy) k influenčnému antigénu leží medzi 1 : 1 až 20 : 1. Ideálne je 3 : 1. Pomer influenčného antigénu k aktívnemu mukozálnemu adjuvans (Toxín) THL alebo CT leží medzi 1 : 2 až 20 : 1. Najvýhodnejší pomer je 7,5 : 1.

Ako je vyššie uvedené, je pomer influenčného antigénu k inaktívnemu mukozálnemu adjuvans (inaktívny toxín) PCG alebo netoxickému derivátu HLT a CT medzi 3 : 1 a 1 : 20, v ideálnom prípade 1 : 2.

Experimenty *in vitro* na meranie imunostimulačného mukozálneho účinku prekvapivo ukázali, že zmes adjuvans lipozómov a mukozálnych adjuvans nespôsobuje adíciu účinkov, ale sa adícia zvyšuje o faktor v hodnote najmenej 5.

Pojem „nový zdravotnícky prístroj“ sa vzťahuje na sprejový aplikátor, ktorý je obzvlášť vhodný na intranazálnu imunizáciu (vakcináciu). Nestačí zostaviť mukozálne účinnú substanciu, ak je aplikácia zlá alebo nedostatočná.

Nový prístroj sa vyznačuje tým, že celkom zohľadňuje anatomickú stavbu nosa:

- 1) Vzdialenosť od manžety na prsty k nástrekovej hlave je výhodne najmenej 4,0 cm.
- 2) Predný diel nosnej časti pozostáva z v podstate valcového nástavca, ktorý je napríklad najmenej 5 mm dlhý a má priemer najviac 5 mm.
- 3) Nástrekový uhol dávkovacieho zariadenia opísaného v tomto vynáleze je výhodne 50 ° až 70 ° k horizontále.

- 4) Os hlavného smeru dávkovacieho zariadenia prípadne sprejového aplikátora sa výhodne stanoví pomocou špeciálnej manžety: manžeta sa výhodne môže nasadiť na predný diel nosnej časti dávkovacieho zariadenia a je vytvorená takým spôsobom, že sa pri nazálnej aplikácii spreja môže oprieť o hornú peru, takže smer nástreku mieri v podstate k laterálnej stene dutiny nosnej.

Vytvorenie manžety k opore na hornej pere je výhodné, pretože horná pera je relatívne blízko nosa a napriek tomu je vzdialenosť dostatočne veľká na to, aby sa vytvorila účinná páka na výhodné nasmerovanie. Okrem toho umožňujú citlivé dotykové senzory na pere užívateľa preskúmať správnu (centrickú prípadne paralelnú) polohu manžety, bez toho aby bolo nutné nazerať do zrkadla. Okrem toho však tiež môže byť manžeta vytvorená k opore na iných partiách tela prípadne hlavy.

Úzka nosná časť má výhodne najmenšiu dĺžku 0,5 cm, lepšie 1 cm a nasledujúca silnejšia nosná časť je výhodne dlhá najmenej 1 cm, výhodne 2 cm. Vzdialenosť medzi dorzálnou plochou pre prsty a špičkou spreja by mala byť najmenej 2 cm, výhodne 2,5 až 3 cm, prípadne by vzdialenosť od plochy pre prsty (manžeta) k špičke spreja mala byť najmenej 3 cm, výhodne 4 až 5 cm. Uhol nástreku spreja by mal byť výhodne 50 ° až 70 ° k horizontále, ak sa hlava drží v normálnej kolmej polohe.

Navyše by mal byť hlavný vektor nastrekovanej dávky smerovaný medzi strednú a spodnú nosnú mušľu. To znamená, že by mal byť smerovaný na strednú časť nosa. To spravidla predpokladá takmer horizontálny smer aplikátora. Takýto smer sa môže fixovať použitím špeciálnej manžety aplikátora, ako sa opisuje v predložennom vynáleze. Tiež je možné vytvoriť manžetu a aplikátor z jedného kusa alebo integrálne. V tomto prípade je upevňovacie zariadenie/spojovacie zariadenie pevne spojené s aplikátorom alebo je s ním vyhotovené z jedného kusa.

V jednej výhodnej forme uskutočnenia ide v prípade sprejového aplikátora o aparát, ktorého nosná časť s nástrekovou hlavou je výhodne najvyššie 5 mm silná a najmenej 5 mm, lepšie 7 mm dlhá, ktorého vzdialenosť

medzi manžetou na prsty až k nástrekovej hlave je najmenej 3 cm a ktorý pomocou pripevniteľnej manžety umožní zavedenie do nosného otvoru tak, že hlavný sektor nosného spreja tvorí s horizontálou uhol asi 15 až 20 °.

V ďalšej výhodnej forme uskutočnenia je antigén zmesou z influenčných povrchových antigénov, ktorá sa prezentuje na povrchu lipozómov. Tento prostriedok sa môže kombinovať s antigénmi ďalších patogénnych mikroorganizmov. Ako už bolo vyššie zmienené, môže preto vakcína podľa vynálezu obsahovať ďalšie antigény, výhodne antigény ďalších patogénnych mikroorganizmov.

V ďalšej forme uskutočnenia slúži vyššie opísaný spôsob na profylaxiu infekčných ochorení, na ošetrovanie upchatého nosa a rôznych poranení povrchu nosnej sliznice.

Prehľad obrázkov na výkresoch

- Obrázok 1 Porovnávacie znázornenie medzi ľudskými turbinaliami a turbinaliami srny
- Obrázok 2 Schematické znázornenie anatomickej stavby vnútorného nosného otvoru
- Obrázok 3 Porovnávacie znázornenie principiálnej stavby výhodnej formy vyhotovenia dávkovacieho zariadenia podľa vynálezu
- Obrázok 4 Znázornenie správneho uhla nástreku pri účinnej aplikácii
- Obrázok 5 Znázornenie nosnej cytologie: kvantifikácia rôznych populácií buniek, ktoré sa získajú technikou nosného steru u indivíduí (20 v každej skupine) až do 29 dní po troch rôznych druhoch intranazálnej vakcinácie. Je potrebné zaznamenať výrazný vzostup centroblastov ako znamenie lokálnej imunitnej odpovede v skupine A oproti výrazne menšiemu vzostupu v skupinách B a C ($p < 0,005$),
- Obrázok 6 Výhodná forma vyhotovenia dávkovacieho zariadenia podľa

vynálezu bez manžety a

Obrázok 7a a 7b dva pohľady výhodnej formy vyhotovenia manžety pre dávkovacie zariadenie podľa vynálezu z obr. 6.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Ďalej budú formou príkladov opísané výhodné formy uskutočnenia vynálezu s odvolaním na obrázky.

Príklad 1

Výroba mukozálnej virozomálnej influenčnej vírusovej vakcíny s HLT ako dodatočným mukozálnym adjuvans.

Výroba influenčnej vírusovej vakcíny sa opisuje v Glück, R., Wegmann, A.: Liposomal presentation of influenza antigens, v Nicholson, K. G., Webster, R. G., Hay, A. J., vydané Textbook of Influenza (1998) strany 400-409, London: Blackwell. V krátkosti výroba zahŕňa: Kmene H1N1 A/Singapur/6/86, H3N2 A/Wuhan/359/95 a B/Beijing/184/93 influenčného vírusu, ktoré sa kultivujú v aktivovaných slepačích vajciach a boli dodané z National Institute of Biological Standards and Control, London, GB. Intaktné virióny sa izolujú chorioalantoisovej kvapaliny zónovou centrifugáciou a inaktivujú sa pomocou β -propiolaktónom. Vyčistené virióny sa vložia do pufra, ktorý obsahuje 0,1 M oktaetylénglykolmono(N-dodecyl)éter (OEG) (Nikko Chemicals, Japan) v PBS-NaCl. Virióny sa inkubujú počas 20 minút pri teplote 21 °C, aby sa umožnilo úplné rozloženie vírusového komponentu.

Na extrakciu hemaglutinínu (HA) a neuramidinázy (NA) sa zmes centrifuguje počas 60 minút pri 100000 g. Zvyšok, ktorý obsahuje HA, NA a vírusové fosfolipidy (PL) sa použije na výrobu rôznych intranazálnych vakcínových formulácií. Pridávajú sa dodatočné fosfolipidy (fosfatidylcholín (Lipoid, Nemecko)) a rozpustia sa. Virozómy sa tvoria spontánne počas odstraňovania detergentu OEG pomocou chromatografie. Do mukozálnej dávky

vakcíny (100 µl), ktorá obsahuje 3,75 µg HA každého z troch influenčných vírusových kmeňov, ako je odporúčané WHO a 35 µg lecitínu, sa pridá 0,5 µg *Heat Labile Toxin* (HLT) z *E. coli* z produkčného kmeňa *E. coli* HE22VK (Vogel, F. R., Powel, M. F.: A compendium of vaccine adjuvants and excipients vo Vaccine Design: The Submit and Adjuvant Approach (M. F. Powel, M. J. Newmann, Hrsg.), Plenum Press, New York (1995) strana 141) ako mukozálny adjuvans.

Príklad 2

Bunky *E. coli* sa sedimentujú v prietokovej centrifúge (Westfalia AG) a suspendujú sa v „Phosphate buffered saline“ (PBS, 6,06 g/l Na₂HPO₄, 1,46 g/l KH₂PO₄, 2,4 g/l NaCl pH 7,4).

Uvoľnenie intracelulárneho toxínu (HLT) labilného pri zvýšenej teplote sa uskutočňuje dezintegráciou buniek v guľovom mlyne (napríklad Dyna-Mill, W. Bachofen AG) alebo vo French-Press. Napríklad: 10 l bunkovej suspenzie sa čerpá pri prietoku 33 ml/minúta guľovým mlynom. Guľový mlyn je naplnený 500 ml sklenených guľí, rotuje 3000 ot/minúta a veľkosť štrbiny je 0,05 mm.

Oddelenie pevných súčastí buniek z dezintegrovaného roztoku sa uskutoční pomocou tangenciálnej mikrofiltrácie. Napríklad: 10 l bunkového lyzátu sa zahustí v Prostak-System (Millipore AG) za použitia filtra s veľkosťou pórov 0,2 µ na asi 4 l. Potom sa premyje 24 l PBS. Permeát sa filtruje sterilným filtrom 0,2 µ (napríklad Gelman Supor DCF, Pall).

Z permeátu sa pomocou afinitnej chromatografie izoluje HLT. Ako stacionárna fáza sa použije imobilizovaná galaktóza (Galaktose-Gel napríklad od firmy Pierce) alebo imobilizovaná laktóza (Lactosyl-Gel napríklad od firmy Pharmacia). Mobilná fáza pozostáva z PBS (pufor A) a 5 % (g/v) laktózy v PBS (pufor A) s polovičnou koncentráciou. Napríklad: sterilizovaný bunkový lyzáat sa nanesie na stĺpec, vopred kondicionovaný pufrom A a stĺpec sa potom premýva pufrom, dokiaľ UV-absorpcia nedosiahne základné čiary 280 nm. Potom sa pomocou pufru B zo stĺpca eluuje HLT.

Príklad 3

Výroba mukozálnej virozomálnej influenčnej vakcíny s PCG ako dodatočným mukozálnym adjuvans

Výroba influenčnej virozomálnej vakcíny sa opisuje v príklade 1. Do mukozálnej dávky vakcíny (100 µl), ktorá obsahuje 3,75 µg HA každého z troch influenčných vakcínových kmeňov ako je odporúčané WHO a 35 µg lecitínu, sa pridá ako mukozálny adjuvans 6 µg procholagenoidu, vyrobeného zahriatím čisteného CT, ktorý pochádza z *V. cholerae* (Inaba 569B) (Pierce, N.F., Cray, W.C., Sacci, J. B., Craig, J.P., Geramnier, R., Fürer, E.: Procholagenoid: A safe and effective antigen for oral immunisation against experimental cholera, *Inf., Immunity* 40, 3, (1983), strana 1112-1118).

Príklad 4

Výroba mukozálnej vakcíny hepatitis B-(HBs)

Fosfatidyletanolamín (R. Berchtold, Biochemisches Labor, Bern, Schweiz) sa rozpustí v metanol a pridá sa 0,1 % (obj./obj.) trietylamínu. Roztok sa potom zmieša s N-hydroxysukcínimidesterom kyseliny gama-maleínimidomaslovej (GMBS) (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) (pomer fosfatidyletanolamín: GMBV = 2: 1), ktorý sa predtým rozpustí v dimetylsulfoxide (DMSO). Po 15 minútach inkubácie pri teplote miestnosti sa rozpúšťadlo odparuje 1 hodinu vo vákuu na centrifúge Speedvac. Rekombinantné častice HBs sa vyrobia známym spôsobom v bunkových líniiach CHO a vyčistia sa.

Aby sa mohla získať redukovaná častica HBs s voľnými cysteínovými zvyškami, spracujú sa častice s 40 mmol/l DL-ditiotreitolu (DTT) počas 5 minút pri teplote miestnosti. DTT sa odstráni s použitím stĺpca Sephadex-G10 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Švédsko) a pridá sa oktaetylalkohol (Fluka Chemicals, Švajčiarsko) v konečnej koncentrácii 100 mmol/l. Odparený

fosfatidyletanolamín-GMBS sa potom mieša 1 hodinu s roztokom HBs (pomer HBs : GMBS = 1 : 2), nenaviazaný GMBS sa potom zachytí cysteínom. Reakcie sa kontrolujú pomocou chromatografie na tenkej vrstve.

Do vopred zosieteného fosfatidyletanolamín-GMBS-HBs sa pridá 32 mg fosfatidylcholínu (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Nemecko) a táto zmes sa rozpustí v celkovom objeme 2,66 ml PBS, ktorý obsahuje 100 mM OEG (PBS-OEG).

Influenčný hemaglutinín A/Singapore sa vyčistí tak, ako sa opisuje vyššie v príklade 1. Roztok, ktorý obsahuje 4 mg hemaglutinínu sa centrifuguje po dobu 30 minút pri 100000 g a sediment sa rozpustí v 1,33 ml PBS-OEG.

Fosfolipidy a roztok hemaglutinínu sa zmiešajú so zmesou a spracujú sa počas 1 minúty ultrazvukom. Zmes sa potom centrifuguje počas 1 hodiny pri 100000 g a zvyšok sa sterilizuje filtráciou (0,22 µm).

Potom sa odstránia virozómy s adsorbovaným HBs odstránením detergentu za použitia BioRad-SM-Bio-Beads podľa príkladu 1. Do kmeňového roztoku obsahujúceho 50 µg antigénu HBs/ml sa pridá 10 µg/ml HLT z príkladu 2 a plní sa do sprejového aplikátora podľa príkladu 6.

Príklad 5

In vitro test na stanovenie aktivity mukozálneho adjuvans

Biologické aktivity mukozálnych adjuvans sa merajú s influenčnými virozómami, HLT, PCG, zmesou virozómov a HLT podľa príkladu 1 a zmesou virozómov a PCG podľa príkladu 2. Nasledujúce roztoky sa pridávajú k vedľajším obličkovým bunkám Y-1 ATCC : CCL 79 (Y-1 adrenalový tumor, mouse steroid secreting) v minikultúre podľa Sack DA a Sack RB (Sack, D.A. a Sack, R. B.: Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y-1 adrenal cells in miniculture, Infect.Olmmun. 11 (1974) strany 334-336:

(a) HLT (5 µg/ml), (b) PCG (60 µg/ml), (c) influenčné virozómy a HLT: 37 µg/ml influenčného hemaglutinínu vždy troch kmeňov (H1N1, H3N2, B), 100

$\mu\text{g/ml}$ fosfatidylcholínu a $5 \mu\text{g/ml}$ a rovnako (d) influenčného virozómu a PCG: $37 \mu\text{g/ml}$ influenčného hemaglutinínu vždy troch kmeňov, $100 \mu\text{g/ml}$ fosfatidylcholínu a $60 \mu\text{g/ml}$ PCG.

Stanovujú sa nasledujúce aktivity (v jednotkách):

(a) 15 jednotiek, (b) 6 jednotiek, (c) 80 jednotiek, (d) 36 jednotiek. Najvyššia biologická aktivita adjuvans sa dosiahne zmesou virozómu a HLT alebo virozómu a PCG. Účinok adjuvans sa stanoví pomocou parametra toxicity bunky.

Príklad 6

Klinické hodnotenie rôznych sprejových aplikátorov

Dávkovacie zariadenie podľa vynálezu je svojou základnou konštrukciou v podstate porovnateľné s obvyklými sprejovými aplikátormi, je však obzvlášť dobre prispôbené anatomickej stavbe pre nazálnu aplikáciu všetkých ľubovoľných, obzvlášť však tu opísaných farmaceuticky účinných látok.

Výhodná forma vyhotovenia dávkovacieho zariadenia 2 podľa vynálezu je zobrazená na obrázkoch 3 a 6. Na bočnom pohľade znázornenom na obrázku 3 dávkovacieho zariadenia 2 podľa vynálezu (sprejový aplikátor) sa rozoznajú základné komponenty. Dávkovacie zariadenie 2 obsahuje v podstate zásobník 4 s (nezobrazenou) farmaceuticky účinnou látkou a sprejový, prípadne čerpací mechanizmus 6. Tento čerpací mechanizmus 6 je neprietokovo spojený so zásobníkom 4 spojovacím prvkom 8. Nástrek a čerpanie dávkovacím zariadením podľa vynálezu 2 sa deje obvyklým spôsobom ovládaním manžety pre prsty 10. Farmaceuticky účinná substancia nachádzajúca sa v zásobníku 4 vystupuje otvorom 12 z čerpacieho mechanizmu do výstupného otvoru 14.

Dávkovacie zariadenie podľa vynálezu 2 sa od známych sprejových aplikátorov odlišuje obzvlášť konštrukčným vyhotovením nosnej časti 16, ktorá pre efektívnu aplikáciu farmaceuticky účinnej látky hrá podstatnú úlohu. Nosná

časť 16 je výhodne vytvorená integrálne s čerpacím mechanizmom 6 a manžetou pre prsty 10. Nosná časť je výhodne rozdelená do dvoch úsekov 18 a 20, pričom úsek 18 umiestnený v smere manžety pre prsty 10 má väčší priemer ako susedný úsek 20 smerujúci k výstupnému otvoru 14 nosnej časti 16. Prechodová oblasť medzi oboma úsekmi 16 a 20 tvorí zarážku pre manžetu 24 na opretie na hornej pere užívateľa, ktorou je možné upevniť v úseku 20 nosnej časti 16 podľa jednej výhodnej formy vyhotovenia predloženého vynálezu.

Úsek 20 nosnej časti 16 susediaci s výstupným otvorom 14 je výhodne vytvorený v podstate valcovite a má priemer d_{20} maximálne 5 mm, výhodne niečo medzi 2 a 4 mm. Dĺžka l_{20} predného úseku 20 nosnej časti 16 je napríklad najmenej 5 mm, výhodne najmenej 10 mm a obzvlášť výhodne 10 až 20 mm. Manžeta 24 je výhodne posuvná od výstupného otvoru 14 cez úsek 20 nosnej časti 16 a výhodne je upevnená so zaistením proti otáčaniu na dávkovacom zariadení 2. Poistka proti otáčaniu sa môže napríklad realizovať v podobe polygonálneho profilu, napríklad s eliptickým prierezom, na prednom úseku 20 nosnej časti 16 a zodpovedajúceho vybrania 26 v manžete 24.

Spôsobom zodpovedajúcim ďalšej forme vyhotovenia dávkovacieho zariadenia 2 podľa vynálezu môže byť časť sprejového aplikátora vstupujúca do nosa pacienta vytvorená tiež na manžete 24. Takáto forma vyhotovenia je napríklad znázornená na obrázku 7b. Ako je na obrázku 7b zobrazené, je na manžete 24 vytvorený v podstate rúrkovitý nástavec 28, ktorý je možné nasadiť na úsek 20 nosnej časti 16, susediaci s výstupným otvorom 14. Rozmery rúrkovitého nástavca 28 zodpovedajú v tomto prípade výhodne v podstate rozmerom (d_{20} a l_{20}) vyššie opísanej formy vyhotovenia.

Úsek 18 nosnej časti 16 má výhodne dĺžku l_{18} najmenej 10 mm a výhodne asi 20 mm. Rozmery oboch úsekov 18 a 20 sa výhodne volia tak, aby vzdialenosť medzi dorzálnou plochou pre prsty užívateľa a špičky spreja prípadne výstupného otvoru 14 bola najmenej 2 cm, výhodne však 2,5 až 3 cm. To je zaistené obzvlášť vtedy, ak vzdialenosť medzi manžetou 24 až k špičke spreja 14 je najmenej 3 cm alebo výhodne 4 až 5 cm.

Dávkovacím zariadením 2 podľa vynálezu s týmito rozmermi možno nastriekať farmaceuticky účinnú látku do hlavnej nosnej dutiny prípadne do vnútorného nosného otvoru podstatne presnejšie, takže je možné dosiahnuť podstatne vyššiu účinnosť ako so známymi systémami.

Dávkovacie zariadenie 2 podľa vynálezu je výhodne vybavené manžetou 24, takže navyše k priaznivým rozmerom je možné nastaviť optimálny uhol nástreku α . Manžetu 24 možno však nezávisle od vyššie opísaného sprejového aplikátora 2 umiestniť na obvyklých dávkovacích zariadeniach, takže i s týmito obvyklými sprejovými aplikátormi možno dosiahnuť podstatne zlepšenú účinnosť na základe presne nastaviteľného uhla nástreku α .

Dávkovacie zariadenie 2 podľa vynálezu môže ďalej dosahovať zlepšenú účinnosť buď voľbou rozmerov nosnej časti 16 alebo vhodnou manžetou 24 na nastavenie optimálneho uhla nástreku α . Obzvlášť sa však kombináciou nového dávkovacieho zariadenia 2 s vyššie opísanými rozmermi a manžetou 24 na nastavenie optimálneho uhla nástreku α dosahujú najlepšie možné výsledky ošetrovania.

Manžeta 24, ako už bolo skôr krátko opísané, sa posunuje rúrkovitým nástavcom 28 po úseku 20 nosnej časti 16. V montovanom stave je manžeta 24 výhodne spojená s dávkovacím zariadením 2 bez možnosti otáčania. Napríklad môže byť poistka proti otáčaniu na nosnej časti 16 kruhový profil sploštený najmenej na jednej strane, ktorým sa môže manžeta 24 pomocou zodpovedajúcim spôsobom tvarovaného otvoru montovať bez možnosti otáčania. Manžeta 24 vykazuje opierku 30, ktorá sa môže oprieť na hornú peru užívateľa, aby sa tak spoločne s nosnou časťou 16 vybavenou úsekom 20, ktorý smeruje do nosného otvoru pacienta, definovane stanovil uhol nástreku. Optimálny uhol nástreku α leží výhodne medzi 50 ° a 70 °.

Opierka 30 manžety 24 je výhodne ľahko zahnutá v tvare hornej pery, aby vytvorila optimálnu plochu na umiestnenie a oporu. Manžeta 24 sa môže vyrobiť z každého vhodného materiálu, výhodné sú však všetky plasty schopné vstrekového liatia.

Na hodnotenie účinnosti sa testovali rôzne dávkovacie zariadenia. Za tým účelom sa do piatich rôznych typov nosných aplikátorov naplnil 1 % roztok metylénovej modrej:

- a) sprejový aplikátor podľa tohto vynálezu so smerovou manžetou, ktorá fixuje smer sprejovej dávky,
- b) sprejový aplikátor podľa tohto vynálezu bez smerovej manžety,
- c) obvyklý komerčný sprejový aplikátor bez úzkej nosnej časti s dĺžkou 2 cm a priemerom 4 mm s uhlom nástreku 50 °,
- d) sprejový aplikátor podľa tohto vynálezu, avšak s uhlom nástreku 50 °,
- e) sprejový aplikátor podľa tohto vynálezu, avšak s manžetou pre prsty, ktorá je od nástrekového hlavice vzdialená iba 3 cm.

Všetky sprejové aplikátory sú tak zvané dvojdávkovacie aplikátory. Každý sprejový aplikátor vyskúšalo pod lekársym dozorom 5 pokusných osôb. Pokusné osoby striekali vždy jednu dávku roztoku metylénovej modrej do vlastného pravého a ľavého nosného otvoru. Pomocou nosnej endoskopie sa vysvietia mukózne turbinálie a fotograficky sa dokumentujú. Intenzita modrého sfarbenia rovnako ako modro zafarbená plocha na turbináliách sa vyhodnotí pomocou stupnice 1 - 4. Vyhodnotenie poskytuje nasledujúce výsledky (geometricky stred):

skupina a)	19 bodov
skupina b)	16 bodov
skupina c)	7 bodov
skupina d)	9 bodov
skupina e)	12 bodov.

Iba v skupine a) bola sprejová kvapalina aplikovaná takmer výhradne na nosnú sliznicu. Tiež v skupine b) bola veľká časť obsahu spreja nastriekaná na sliznicu. V ostatných skupinách bola podstatná časť obsahu spreja nastriekaná do nosnej predsiene. Tam nemôže aplikovaná sprejová kvapalina vykazovať

žiadnu účinnosť.

Príklad 7

Porovnanie klinickej účinnosti intranazálnych virozomálnych influenčných vakcín s HLT a bez HLT, použitých v novom sprejovom prístroji, ktorý sa opisuje v predloženom vynáleze, na ľudských dobrovoľníkoch v porovnaní s parenterálnou komerčnou influenčnou vakcínou.

Otvorená randomizovaná klinická štúdia bola uskutočňovaná v plnej zhode s princípmi helsinského prehlásenia a s miestnymi zákonmi a smernicami týkajúcimi sa klinických štúdií. Po schválení protokolu etickou komisiou kantonu Luzern a po oznámení na Schweizer Bundesgesundheitsbehörde dalo 80 zdravých dobrovoľníkov (vo veku 18 - 64 rokov) svoj informovaný súhlas s účasťou. Boli vylúčení dobrovoľníci, ktorí k okamihu imunizácie vykazovali symptómy akútneho alebo chronického ochorenia a ak by zároveň dochádzalo k súčasnému ošetrovaniu imunosupresívnymi liekmi alebo ak by došlo k známemu oslabeniu imunity.

Intranazálne formulácie vakcíny sa podávajú každej z troch skupín s 20 dobrovoľníkmi (tabuľka 1). Skupiny A a B obdržali 2 dávky formulácie A prípadne B do každého nosného otvoru v dni 1 a 2 dávky o týždeň neskôr. Skupina C obdržala 2 dávky formulácie A s dvojitou koncentráciou v dni 1. Skupina D bola intramuskulárne očkovaná parenterálnou formuláciou do oblasti deltoidu. Pred prvou vakcináciou a po jednom mesiaci po prvej imunizácii (deň 29 ± 2) boli odobraté vzorky krvi a slín (Omnisal^R, GB). V dôsledku technických problémov bolo možné vyhodnotiť vzorky slín iba prvých 47 osôb. Stieracia cytológia nosnej dutiny bola uskutočnená pred imunizáciou a v dňoch 4, 8 a 1 mesiac po prvej imunizácii.

Pre analýzy boli krvné vzorky a vzorky slín kódované.

Sérová imunitná odpoveď na komponent vakcíny HA sa stanoví štandardným testom za použitia hemaglutinínových jednotiek zodpovedajúcich antigénov. Séra sa pred testom spracujú 30 minút pri teplote 56 °C. Titry sú

vyjadrené ako recipročná hodnota najvyššieho zriedenia séra, ktoré úplne zabráni hemaglutinácii. Titer s hodnotou $\geq 1 : 40$ bol nájdený ako chrániaci.

Všeobecne a influenčne špecifické IgA protilátky boli stanovované pomocou známych spôsobov ELISA (Tamura, S. I., Ito, Y., Asanuma, H. a spol., Cross-protection against influenza virus infection afforded by trivalent inactivated vaccines inoculated intranasally with cholera toxin B subunit. J. Immunol. 149, (1992) strany 981-987). Vírusovo špecifické hodnoty IgA boli vyjadrené ako ELISA-jednotky špecifickej IgA na μg celkovej koncentrácie IgA.

Nosné epitelové bunky boli odobraté výhradne z Maxillo-turbinát oboch nosných dutín každej osoby rovnakým typom malej nylónovej kefy, ktorá sa používa pri cytopatologických vyšetreniach počas bronchoskopie (Glück, U., Gebbers, J-O., Nasal cytopathology in smokers: a possible biomarker of air-pollution? Am. J. Rhinol. 10, (1996), strany 55-57). Odber vzorky bol uskutočňovaný rovnakým vyšetrovateľom (U.G) pod rhinoskopickou kontrolou rotačnými a translačnými pohybmi pozdĺž spodného prichytenia turbinát. Bunky boli prenesené na sklenený prípravok a okamžite fixované v roztoku 200 ml etanolu + 100 ml acetónu + 6 kvapiek kyseliny trichlóroctovej.

Sklička s objektom sfarbeným pomocou papanicolaou bolo vyšetrené patológom, ktorý absolvoval Institut für Pathologie und Cytopathologie, nemocnice kantonu Luzern, a ktorý nebol informovaný o stave vakcinácie.

Priemerné počty buniek, kmitajúcich buniek, pohárikových buniek, lymfocytov, centroblastov, neutrofilov, eozinofilov a šupinkových buniek epitelu sa stanovovali v 25 reprezentatívnych oblastiach sklička s objektom pri 100x násobnom zväčšení.

Signifikácia medzi titrom základnej línie a postimunizačným titrom bola stanovená pomocou testu Paired-T. Rozdiely v schopnosti 4 vakcináciou vyvolať v skúmanej skupine ochranné protilátky anti-HA boli stanovené pomocou χ^2 .

Všetky nežiaduce príhody pozorované počas klinickej štúdie museli byť zaznamenané. Nežiaduca príhoda bola definovaná ako nežiaduca zmena stavu

základných línií (stavu pred vakcináciou) osôb, bez ohľadu na to, či sa výsledok považuje za súvisiaci s vakcináciou alebo nie. Nežiaduce príhody (lokálna alebo systemická reakcia), ku ktorej došlo po imunizácii, boli pracovníkmi kliniky zaznamenané na špeciálnom formulári pre nežiaduce príhody. Miera základnej línie nežiadúcich príhod bola stanovená pred imunizáciou.

Na štúdiu bolo získaných 80 osôb s priemerným vekom 40 rokov a s porovnateľným sociálnym statusom. 27,5 % účastníkov bolo ženského pohlavia. Všetky 3 nazálne vakcinačné prípravky a rovnako parenterálna vakcína boli dobre znášané. Anamneticky neboli žiadne významné rozdiely medzi tromi skupinami nosnej vakcíny a všetky tri prípravky boli dobre znášané. V jednotlivých prípadoch boli následne zaznamenané možné sprievodné reakcie: horúčka, únava, nevoľnosť, rinitída, upchatý nos a rinofaryngitída. Tiež parenterálna virozomálna vakcína bola mimoriadne dobre znášaná.

Serologická imunitná odpoveď je uvedená v Tabuľke 2. Významné vzostupy titra boli namerané v skupine A (2 nazálne vakcinácie v 7-dennom odstupe), skupine C (1 nazálna vakcinácia, dvojité dávka) a rovnako v skupine D (parenterálna vakcinácia proti všetkým trom vírusovým kmeňom). Najvyššie geometrické stredy titra protilátok (GMT) boli nájdené v skupinách A a D. Skupina D mala významne najvyššie hodnoty (GMT) proti kmeňu H1N1 ($p \leq 0,05$). V prípade kmeňa H3N2 neboli žiadne významné rozdiely medzi skupinami A a D.

Tieto skupiny reagujú významne lepšie ako skupiny B a C. Pri kmeni B neboli žiadne významné rozdiely oproti skupinám A, C a D. Tieto skupiny však vykazovali výrazne vyšší titer ako skupina B. Miera konverzie séra bola najvyššia v skupinách A a D. Zvyčajne boli výrazne vyššie ako miera v skupinách B a C a pre všetky tri kmene splňovali sérologické požiadavky na parenterálnu influenčnú vakcínu podľa Európskeho spoločenstva (Komisia Európskeho spoločenstva, smernice pre zdravotnícke prostriedky v Európskom spoločenstve. Harmonizácia požiadaviek na influenčnú vakcínu. (1992), strany 93-98. Luxemburg: European community Publication Office).

Humorálna mukozálna imunitná odpoveď (sliny) je uvedená v Tabuľke 3.

Najvyššie vzostupy IgA titra boli namerané v skupine A. Tie boli výrazne lepšie ako v iných skupinách. So zohľadnením celkového IgA boli GMT v skupine A rovnako najväčšie. Miera mukokonverzie (štvornásobný vzostup IgA titra) bol opäť výrazne najvyšší v skupine A. V prípade intramuskulárnej vakcinácie sa však dosiahla len veľmi nízka miera mukokonverzie.

Bola uskutočnená stieracia cytológia nosnej sliznice v skupinách A, B a C. Výsledky sú zhrnuté na obrázku 5. Stanovovali sa počty buniek nosnej epitelovej sliznice (kmitajúce a nekmitajúce stĺpcové bunky, pohárikové bunky a šupinkové bunky epitelu) a bunky myelo/mono- a lymfopoiezy (lymfocyty, eozinofily, neutrofilové a centroblasty). V skupine A bolo možné preukázať výraznú hyperpláziu pohárikových buniek 4. a 8. deň po vakcinácii. Okrem toho bol v rovnakých dňoch pozorovaný silný nárast lymfocytov a centroblastov. Navyše bol pozorovaný 8. deň po počiatkovej vakcinácii vzostup eozinofilov a neutrofilov. Počet stĺpcových buniek zostal nezmenený.

V skupine B došlo len k miernemu vzostupu lymfocytov, neutrofilov a eozinofilných granulocytov. Neboli žiadne náznaky aktivovaných lymfocytov v tejto skupine.

V skupine C bola zistená dokonca ešte silnejšia hyperplázia pohárikových buniek ako v skupine B. Okrem toho v tejto skupine stúpili najsilnejšie 4. a 8. deň eozinofilné a neutrofilné granulocyty. Vzostup lymfoblastov bol v tejto skupine slabší ako v skupine A. $p \leq 0,05$. Mesiac po prvej vakcinácii sa vo všetkých skupinách dosiahol pôvodný stav zloženia buniek.

Obrázok 5 sa týka nosnej cytologie: kvantifikácie rozdielnych populácií buniek, ktoré sa získali technikou nosného steru indivíduí (20 v každej skupine) až do 29 dní po troch rozdielnych druhoch intranazálnych vakcinácií. Bol pozorovaný výrazný vzostup centroblastov ako náznaky lokálnej imunitnej odpovede v skupine A v protiklade k výrazne nižšiemu vzostupu v skupinách B a C ($p < 0,05$).

Príklad 8

Porovnanie klinickej účinnosti intranazálnych virozomálnych influenčných vakcín s HTL alebo s PCG na ľudských dobrovoľníkoch, podané novým sprejovým prístrojom, opísaným v predloženom vynáleze

Bola vyšetrovaná imunitná odpoveď a tolerovateľnosť dvoch anti-influenčných sprejových vakcín v dvojitej porovnávacej štúdii, ktorá bola uskutočnená s celkom 158 zdravými švajčiarskymi dobrovoľníkmi vo veku 18 až 67 rokov.

Trivalentná virozomálna influenčná vakcína (čistený HA, formulovaný fosfatidylcholínom) sa kombinuje s *Heat Labile Toxin* (HTL) *E. coli* do formátu, ktorý je vhodný na intranazálne podanie. Ľudská dávka obsahuje 7,5 µg HA každého influenčného kmeňa a 2 µg HLT. Jedna dávka bola podaná do každého nosného otvoru 1. a 8. deň v skupinách indivíduí v rokoch 18 až 59 alebo ≥60 rokov. Vzorky séra boli odobraté asi 4 týždne po imunizácii. Reakcie boli riedke a slabé. Percentuálne podiely osôb (dospelí prípadne staršie), ktoré dosiahli chrániaci titer protilátok sérum-anti-HA (≥ 40) boli nasledujúce: A/Bayern (92 %, 91 %), A/Wuhan (92 %, 78 %) a B/Beijing (59 %, 50 %). GMT po imunizácii a násobky vzostupu GMT boli medzi oboma vekovými skupinami porovnateľné. Percentuálny podiel osôb (dospelí prípadne starší), ktoré nedosiahli ochranný titer základnej línie, ale po imunizácii dosiahli ochranné hladiny bol nasledujúci: A/Bayern (79 %, 85 %), A/Wuhan (86 %, 56 %) a B/Beijing (48 %, 41 %).

Druhý mukozálny vakcínový prípravok obsahoval 7,5 µg HA a 12 µg procholagenoidu (PCG). Tento prípravok bol rovnako dobre znášaný a dokázal sa ako menej imunogénny ako prípravok HLT. Percentuálne podiely osôb, ktoré dosiahli chrániaci titer protilátok sérum-anti-HA boli nasledujúce: A/Bayern 94,2 %, A/Wuhan 80,8 % a B/Beijing 36,5 %. Miery konverzie séra všetkých skupín sú uvedené v Tabuľke 4.

Tieto výsledky ukazujú, že virozomálna influenčná vakcína podaná intranazálnou cestou je istejšia a viac imunogénna u dospelých osôb včítane

starších.

Príklad 9

Mukozálna imunitná odpoveď na myšiach po intranazálnom použití virozomálnej influenčnej vakcíny s HTL, s PCG alebo bez dodatočných mukozálnych adjuvans

Skupiny 10 dospelých samičiek myší Balb/c boli intranazálne očkované 30 μ l buď influenčnej vakcíny opísanej v príklade 1 alebo v príklade 2. Kontrolné skupiny 10 myší obdržali virozomálny prípravok vakcíny bez dodatočných adjuvans, ale s rovnakým zložením virozómov. Polovica každej skupiny obdržala druhú intranazálnu dávku o týždeň neskôr. Tri týždne neskôr boli uskutočňované výtery nosu (NW) a bronchoalveolárne preplachy (BAL). Tabuľka 5 k príkladu 9. Stanovenie špecifickej IgA bolo uskutočnené známym postupom ELISA. Výsledky (GMT) sú zhrnuté v Tabuľke 6.

Najvyšší GMT bolo možné preukázať pre všetky tri kmene vakcín (A/Johannesburg, A/Nanching, B/Harbin) v skupine, ktorá bola dvakrát očkovaná vakcínou podľa príkladu 1. Táto skupina reagovala dokonca s najvyššou hladinou IgA v BAL po iba jednom očkovaní.

Uspokojivá IgA odpoveď sa získala tiež v skupine myší, ktoré boli očkované dvakrát intranazálne prípravkom podľa príkladu 2. Kontrolná skupina, na ktorú bol použitý prípravok virozómu bez dodatočného mukozálneho adjuvans, vykazovala len veľmi slabú mukozálnu imunitnú odpoveď.

Výsledky ukazujú, že virozomálna influenčná vakcína podaná intranazálne myšiam, ktorá obsahuje mukozálna adjuvans môže indukovať vysokú mukozálnu odpoveď protilátok.

Predklinická štúdia virozomálnej influenčnej vakcíny na myšiach: intranazálne použitie (Tabuľka 5 k príkladu 9)

	Skup. 1	Skup. 2	Skup. 3	Skup. 4	Skup. 5	Skup. 6
Deň 0	Infl.- Viros.+ HLTi.n.	Infl.- Viros.+ HLTi.n.	Infl.- Viros.+ PCGi.n.	Infl.- Viros.+ PCGi.n.	Influenčný virozóm	Influenčný virozóm
Deň 7	Infl.- Viros.+ HLTi.n.	-	Infl.- Viros.+ PCGi.n.	-	Infl.- Viros. i.n.	-
Deň 28	NW&BAL	NW&BAL	NW&BAL	NW&BAL	NW&BAL	NW&BAL

IgA influenčné protilátky na myšiach GMT recipročného titra (ELISA) (Tabuľka 6 k príkladu 9)

Skupina	H1N1 NW	H1N1 BAL	H3N2 NW	H3N2 BAL	B NW	B BAL
1	320	12800	380	3200	320	9220
2	neg.	140	neg.	24	neg.	1540
3	160	760	470	760	220	770
4	neg.	neg.	neg.	neg.	10	neg.
5	4	neg.	neg.	neg.	4	neg.
6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Príklad 10

Klinické hodnotenie mukozálnej vakcíny Hepatitis-B-(HBs-)

Vakcína sa vyrobí podľa príkladu 4 a naplní sa do nosného sprejového aplikátora podľa príkladu 5. Výrobok sa testuje na 10 dobrovoľníkoch: vždy 100 µl sa aplikuje 1. deň do každej nosnej dierky a opakuje sa o týždeň neskôr. Vzorky krvi sa odoberú 1. deň (pred očkovaním) a potom 29. deň. Protilátky anti-HBs sa stanovujú pomocou RIA (Abbott). Geometrický stred titra pred očkovaním je 7 IU/ml a 29. deň 159 IU/ml.

Príklad 11

Mukozálna imunitná odpoveď na myšiach po intranazálnom použití DNA-plazmidu, ktorý bol kódovaný pre HN-antigén vírusu zápalu príušnic, vnesený do influenčného virozómu, ktorý obsahuje 10 % kationových fosfolipidov, a zmiešaný s HLT (5 µg/1 ml)

Intranazálne boli imunizované skupiny myší a) bez DNA, ktorá kóduje pre HN-antigén vírusu zápalu príušnic (skupina C), alebo b) DNA uzavretú vo virozóme po predbežnej imunizácii virozómami (skupina A) alebo c) bez predbežnej imunizácie (skupina B). Kontrolná skupina (B) bola i.n. imunizovaná žijúcimi vírusmi Urabe zápalu príušnic (Priorix, SKB Rixensart). Ako je uvedené v Tabuľke 7, je geometrický stred titra (GMT) IgT v skupine myší, ktoré získali predbežnú imunizáciu (A) vyšší ako aký bol opísaný v skupinách (B) a (C) (Lovell, G.H.: Proteosomes, hydrophobic anchors, iscoms and liposomes for improved presentation of peptide and protein vaccines. v *New Generation Vaccines* (1990) (G. C. Woodrow a M. M. Levine, vydávateľ) Dekker, New York, strany 141-168; Cusi, M.G. a Glück, R.: Intranasal immunization of mice with mups DNA entrapped into influenza virosomes. IBC s 4th Annual Conference of Genetic Vaccines, 25.-27. októbra 1998, Washington D.C.). Skupina myší, ktorá bola imunizovaná i.n. bez DNA, vyvinula veľmi nízku hladinu IgG, oproti tomu myši imunizované i.n. vírusom zápalu príušnic (skupina H) vykazovala dobrú IgG odpoveď. Pri analýze mukozálnej imunity bolo zistené, že všetky skupiny myší, okrem tých, ktoré boli imunizované bez DNA, vyvinuli IgA. Iba v nosných steroch (NW) myší imunizovaných i.n. vírusom zápalu príušnic bolo možné preukázať zvýšený titer IgA.

Merania cytokínu boli uskutočnené za použitia primárnych buniek sleziny z myší sleziny, ktoré boli odobraté 12 dní po imunizácii. Tabuľka 8 zhrňuje reprezentatívne merania, ktoré boli získané z dvoch oddelených pokusov. Bunky z myší, ktoré boli vopred (i.n.) očkované DNA-virozómami, stimulované antigénmi vírusu zápalu príušnic, indukovali produkciu IL-2 a IFN-*gama*. Okrem toho indukovali myši infikované chrípkou produkciu IL-4. Bunky odobraté zo

zvierat imunizovaných vírusom zápalu príušnic produkovali po *in vitro* stimuláciu antigény zápalu príušnic IFN-*gama*, IL-2, IL-4 a IL-10. Imunizácia DNA-virozómami ako kontrolná imunizácia s čistenými antigénmi zápalu príušnic koreluje s fenotypom Th-1. Okrem toho sa zohľadnením pomeru medzi celkovou hladinou IgG a vírusovo špecifickými IgG1 a IgG2a dominuje množstvo IgGa-izotypu v skupine (A), čo naznačuje odpoveď Th-2.

Tabuľka 7 - Geometrický stred titra (GMT) humorálne IgG, IgA v bronchoalveolárnom premytí (BAL) a IgA v nosnom výtere myši

Myši	IgG	BAL IgA	NW IgA
Skupina A	356	8	10
Skupina B	15	11	10
Skupina C	12	2	2
Skupina H	1585	2	20

Tabuľka 8 - Reprezentačné meranie produkcie cytokínu na myšiach, získané z dvoch oddelených pokusov

Skupina	IL-2	IFN- <i>gama</i>	IL-4	IL-10
A	300	300	150	0
B	150	625	0	0
C	300	100	0	0
D	600	100	150	600

Príklad 12

Ošetrovanie upchatého nosa u dobrovoľníkov pomocou influenčného virozómu s HLT a bez HLT s novým sprejovým aplikátorom

Na klinike bolo vybraných 30 dobrovoľníkov so symptómami nachladenia

a s akútne upchatým nosom. U všetkých dobrovoľníkov bola rinomanometricky (v Pascaloch) zmeraná intenzita dýchania každou jednotlivou nosnou dierkou. Následne boli dobrovoľníci randomizovaní a rozdelení do troch skupín po desiatich. Skupina A obdržala jednu dávku očkovacej látky (100 µl do každej nosnej dierky) podľa príkladu (1), skupina B obdržala rovnakú dávku, avšak bez mukozálneho adjuvans HLT, skupina C obdržala po 100 µl 0,9 % NaCl (fyziologický roztok kuchynskej soli) do každej nosnej dierky. Prúdy vzduchu boli merané 15 minút, 30 minút, 1 hodinu a 2 hodiny neskôr.

Zistené údaje sú uvedené v Tabuľke 9. Ako v skupine A tak i v skupine B boli hodnoty výrazne lepšie ako v skupine C. V oboch skupinách bolo možné zistiť výrazné zlepšenie dýchacej funkcie.

Tabuľka 9

Skupina	Intenzita dýchania v Pascaloch				
	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

Príklad 13

Ošetrovanie mukozálnych lézií u dobrovoľníkov pomocou influenčných virozómov a HLT

Dobrovoľníci boli intranazálne očkovaní rovnako ako sa opisuje v príklade 7. Ako je opísané, stanovujú sa priemery pohárikových buniek 3, 7 a 28 dní po intranazálnej vakcinácii. Bolo možné stanoviť zmeny epitelu hyperplázií pohárikových buniek v cytologických steroch (Glück, U., Gebber, J-O.: Nazal cytopathology in smokers: a possible biomarker of air pollution? Am.J. Rhinol. 10 (1996) strany 55-57). Pohárikové bunky majú chrániacu

funkciu pre mukóznú vrstvu. Jeden mesiac po prvej nazálnej vakcinácii bol bunkový stav mukózy výrazne lepší ako v porovnaní s predchádzajúcim stavom.

Táto nová vakcína sa preto môže používať ako terapeutikum na ošetrovanie nosnej sliznice v poškodenom stave.

Príklad 14

Prevenca enterotoxickéj *E. coli*-diarrhoe pomocou nazálnej aplikácie HLT s influenčnými virozómami a bez nich

Skupina cestujúcich, ktorí navštívili Tunis, pozostávala z 38 osôb. Po informovanom súhlase pristúpili všetci účastníci k štúdii. Po randomizácii bolo 19 dobrovoľníkov v odstupe 1 týždňa očkovaných prípravkom podľa príkladu 1, pričom 19 osôb neobdržalo žiadnu očkovaciu látku. 28 dní po prvom intranazálnom očkovaní boli odobraté vzorky krvi všetkých dobrovoľníkov. 19 očkovaných osôb vykazovalo vysokú hladinu IgG v sére oproti mukozálnemu adjuvans (HLT). Kontrolná skupina zostala anti-HLT negatívna. Pred opustením Tuniska, jeden mesiac neskôr, bol všetkým účastníkom predložený špeciálny formulár, týkajúci sa zdravotných príhod. Skupina sa 20 dní neskôr vrátila z Tunisu a vyplnené formuláre týkajúce sa zdravotných príhod boli vyhodnotené z hľadiska ochorenia diarrhoe. V skupine očkovaných informovali iba dve osoby o problémoch s diarrhoe, oproti tomu v skupine neočkovaných osôb 9 osôb trpelo počas pobytu v Tunisku diarrhoe. Tieto údaje dokazujú, že vakcína je účinná tiež na zabránenie diarrhoe enterotoxických ochorení *E. coli*.

Príklad 7

Tabuľka 1 - Klinický protokol

Skupina	N samčia	Stredný vek v rokoch	Počet vakcinácií (odstup)	Použitie	Prípravok v µg úplnej vakcinácie HA na kmeň	Prípravok v µg úplnej vakcinácie HLT
A	20/14	39,7	2 1 týždeň	intranasálne	15	2
B	20/14	35,5	2 2 týždeň	intranasálne	15	-
C	20/16	43,8	1	intranasálne	15	2
D	20/14	41,2	1	intramuskulárne	15	-

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Vakcína na intranazálnu aplikáciu, pozostávajúca z:

- a) proteínov s influenčným povrchom, ktoré sú formulované lipozomálne (virozómy),
- b) mukozálneho adjuvans bakteriálneho pôvodu,
- c) špecifického sprejového aplikátora, ktorý je konštruovaný tak, že takmer 100 % sprejovanej dávky môže byť aplikované v celom objeme na nosné sliznice dôležité pre účinnosť,

2. Vakcína podľa nároku 1, u ktorej influenčný povrchový proteín je hemaglutinín HA.

3. Vakcína podľa nároku 1 alebo 2, u ktorej influenčné povrchové proteíny sú hemaglutinín HA a neuraminidáza NA.

4. Vakcína podľa niektorého z nárokov 1 až 3, ktorá obsahuje ďalšie antigény.

5. Vakcína podľa nároku 4, u ktorej ďalšie antigény sú viazané na povrchu virozómov.

6. Vakcína podľa niektorého z nárokov 4 a 5, u ktorej antigény sú antigény patogénnych organizmov.

7. Vakcína podľa nároku 6, u ktorej patogénny organizmus je vírus, baktéria, huba alebo parazit.

8. Vakcína podľa nároku 7, u ktorej vírus, baktéria, huba alebo parazit sa vyberú zo skupiny pozostávajúcej z: vírus hepatitídy A, vírus hepatitídy B, vírus respiračný *Syncytial*, (pneumovírus), parainfluenzavírus, vírus príušníc, vírus morbilli, HIV, baktérie diftérie, (*Corynebacterium diphtheriae*), tetanový bacil (*Clostridium tetani*), pneumokoky, *Haemophilus influenzae*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*,

Candida krusei, *Aspergillus-arten*, druhy *Trichomonas*, druhy *Trypanosoma*, druhy *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, druhy *Trematodov* a *Nematodov*.

9. Vakcína podľa niektorého z nárokov 1 až 8, ktorou je influenčná vakcína.

10. Vakcína podľa niektorého z nárokov 1 až 9, ktorá sa môže používať na prevenciu a/alebo ošetrovanie všeobecných infekcií/infekčných ochorení.

11. Vakcína podľa niektorého z nárokov 1 až 10 na prevenciu a/alebo ošetrovanie influenčných ochorení.

12. Vakcína podľa nároku 10 alebo 11 na prevenciu a/alebo ošetrovanie upchatého nosa.

13. Vakcína podľa niektorého z nárokov 10, 11 alebo 12 na ošetrenie poškodených nosných slizníc.

14. Vakcína podľa niektorého z nárokov 1 až 13, u ktorej obsah hemaglutinínu na dávku (100 µl) leží medzi 1 - 30 µg, výhodne medzi 3 - 10 µg a najlepšie 3,75 µg.

15. Vakcína podľa niektorého z nárokov 2 až 14, u ktorej pomer lipozómy-fosfolipid k HA leží medzi 1 : 10 a 20 : 1.

16. Vakcína podľa nároku 15, u ktorej pomer lipozómy-fosfolipid k HA leží medzi 1 : 1 a 10 : 1.

17. Vakcína podľa niektorého z nárokov 15 a/alebo 16, u ktorej pomer je 3 : 1.

18. Vakcína podľa niektorého z nárokov 15 až 17, u ktorej fosfolipid lipozómu sa vyberie zo skupiny neutrálnych, kationových a aniónových fosfolipidov.

19. Vakcína podľa niektorého z nárokov 1 až 18, u ktorej mukozálny adjuvans je aktívny toxín, inaktívny toxín a/alebo ich netoxický derivát.

20. Vakcína podľa nároku 19, u ktorej toxín a/alebo jeho netoxický derivát je *Heat Labile Toxin* (HLT), choleratoxín (CT) a/alebo procholeraenoid (PCG).

21. Vakcína podľa niektorého z nárokov 1 až 20, ktorá obsahuje *Heat Labile Toxin* (HLT) a/alebo choleratoxín (CT) v pomere, ktorý leží medzi 1 : 2 až 20 : 1, výhodne medzi 1 : 1 až 1 : 10 a obzvlášť 7,5 : 1.

22. Vakcína podľa niektorého z nárokov 19 a 20, ktorá obsahuje teplom inaktivovaný procholeraenoid (PCG), rekombinantnou technológiou inaktivovaný HLT a/alebo choleratoxín (CT) ako mukozálny adjuvans, ktorý je v pomere HA : PCG (a/alebo rHLT, a/alebo rCT) medzi 3 : 1 až 1 : 20.

23. Vakcína podľa nároku 22, u ktorej pomer HA : PCG (a/alebo rHLT, a/alebo rCT) leží medzi 1 : 1 a 1 : 10.

24. Vakcína podľa nároku 23, u ktorej pomer HA : PCG (a/alebo rHLT, a/alebo rCT) je 1 : 2.

25. Vakcína podľa niektorého z nárokov 1 až 24, ktorá ďalej obsahuje DNS- a/alebo RNS-plazmidy viazané na a/alebo vo virozómoch.

26. Vakcína podľa niektorého z nárokov 1 až 25, ktorou je influenčná vakcína.

27. Mukozálny adjuvans podľa niektorého z nárokov 1 až 26, ktorý je *Heat Labile Toxin* (HLT), ktorý bol eluovaný z *E. coli* laktózovým pufrom podľa príkladu 2 a vyčistený na chromatografickom stĺpci s Lactosyl-Gel (Pharmacia).

28. Manžeta (24) so spojovacím zariadením (28) na umiestnenie na dávkovacom zariadení (2), obzvlášť na sprejové podanie farmaceuticky účinnej látky podľa niektorého z nárokov 1 až 27 a s oporným zariadením (30), pričom spojovacie zariadenie (28) a oporné zariadenie (30) je usporiadané tak, že spolu definujú optimálny uhol nástreku (α) na dávkovanie substancie z dávkovacieho zariadenia.

29. Manžeta (24) podľa nároku 28, pričom uhol nástreku (α) je medzi 50° a 80° k horizontále.

30. Manžeta (24) podľa nároku 28 alebo 29, pričom spojovacie zariadenie (28) je v podstate valcovitý úsek rúrky.

31. Manžeta (24) podľa nároku 30, pričom úsek rúrky (28) je možné najmenej sčasti posunovať po diele nosnej časti (20) dávkovacieho zariadenia (2).

32. Manžeta (24) podľa niektorého z nárokov 28 až 31, pričom oporné zariadenie (30) je na konci na strane k užívateľovi zahnuté takým spôsobom, že v podstate zodpovedá tvaru vonkajšej časti hornej pery užívateľa.

33. Manžeta (24) podľa niektorého z nárokov 28 až 32, pričom manžeta (24) je na dávkovacom zariadení (2) upevnená tak, že je zabezpečená proti otáčaniu.

34. Manžeta (24) podľa nároku 33, pričom úsek rúrky (28) a diel nosnej časti (20), ktorý je možné posúvať po úseku rúrky (28) je vytvorený najmenej čiastočne v polygonálnom tvare, aby sa tak zaistilo zabezpečenie proti otáčaniu.

35. Dávkovacie zariadenie (2), obzvlášť na sprejové podanie farmaceuticky účinnej látky podľa niektorého z nárokov 1 až 27, s čerpacím zariadením (6) a manžetou pre prsty (10) na ovládanie čerpaceho zariadenia (6), spojovacím prvkom (8) na tesné spojenie so zásobníkom (4) a nosnou časťou (16), ktorá pozostáva z prvého úseku (18) a druhého úseku (20), pričom oba úseky (18, 20) nosnej časti (16) sú dimenzované tak, aby výstupný otvor (14) nosnej časti (16) v podstate smeroval do hlavnej nosnej dutiny pacienta.

36. Dávkovacie zariadenie (2) podľa nároku 35, pričom najmenej druhý úsek (20) nosnej časti (16) je vytvorený v podstate valcovito.

37. Dávkovacie zariadenie (2) podľa nároku 36, pričom priemer druhého úseku (20) je medzi 3 mm a 10 mm, výhodne je asi 7 mm.

38. Dávkovacie zariadenie (2) podľa niektorého z nárokov 35 až 37, pričom druhý úsek (20) nosnej časti (16) má dĺžku medzi 5 mm a 50 mm, výhodne asi 20 mm.

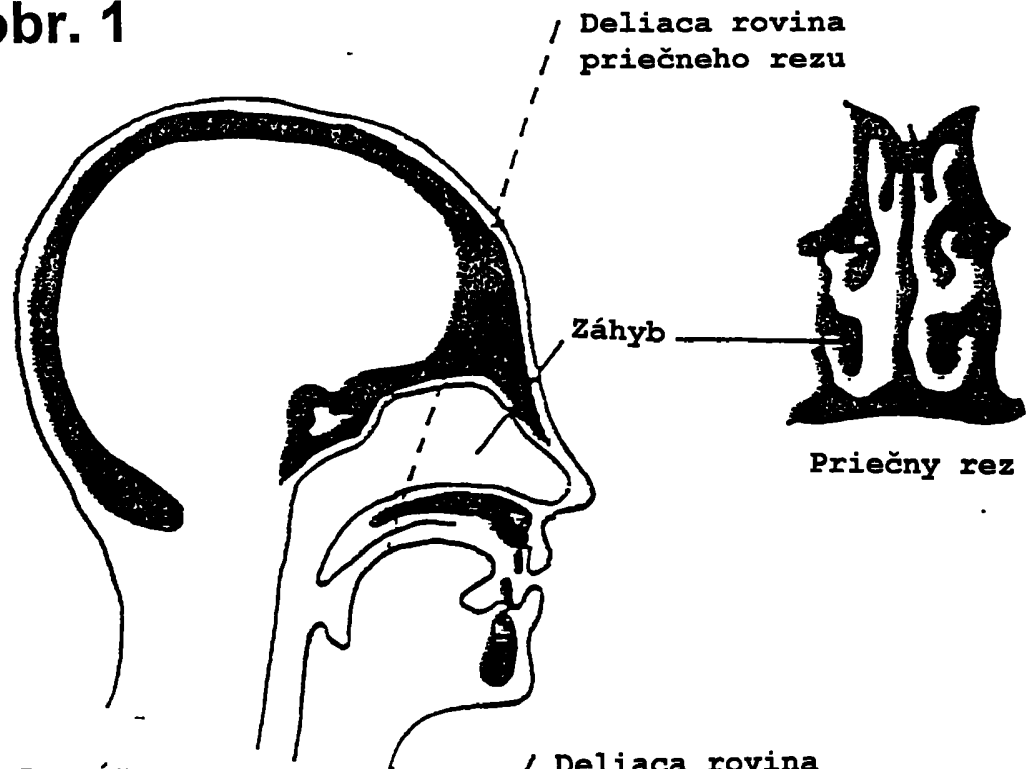
39. Dávkovacie zariadenie (2) podľa niektorého z nárokov 35 až 37, pričom prvý úsek (18) nosnej časti (16) má dĺžku medzi 10 mm a 40 mm, výhodne asi 30 mm.

40. Dávkovacie zariadenie (2) podľa niektorého z nárokov 35 až 39, pričom vzdialenosť medzi manžetou pre prsty (10) a výstupným otvorom (14) umiestneným na špičke je najmenej 30 mm, výhodne asi 45 mm.

41. Dávkovacie zariadenie (2) podľa niektorého z nárokov 35 až 40 s manžetou (24) podľa niektorého z nárokov 28 až 34.

42. Dávkovacie zariadenie (2) podľa nároku 41, ktoré je vytvorené jednodielne prípadne ako jeden kús s manžetou (24).

obr. 1



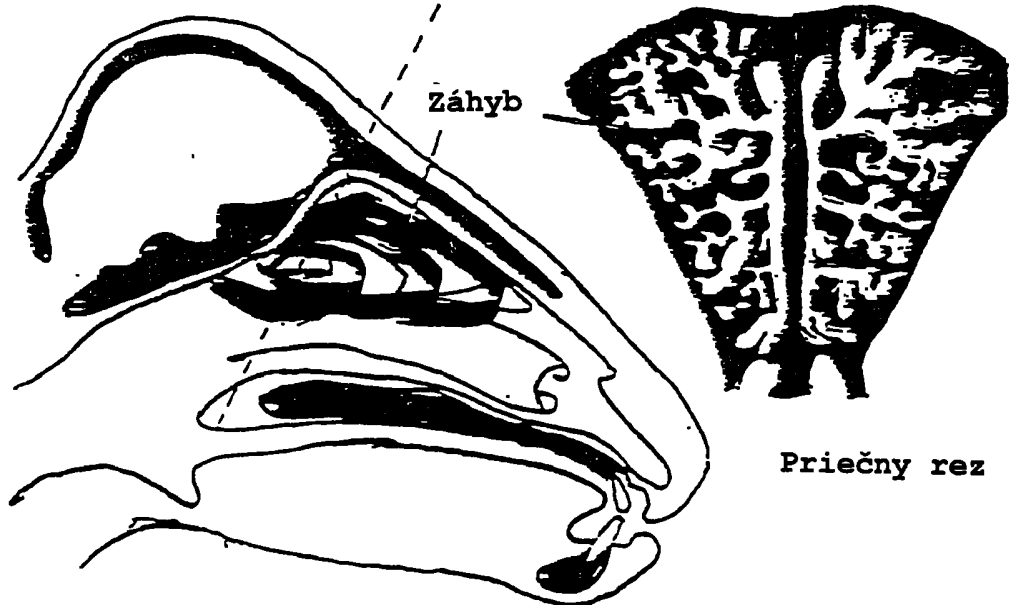
Deliaca rovina
priečného rezu

Záhyb

Priečný rez

Pozdĺžny rez
u človeka

Deliaca rovina
priečného rezu



Záhyb

Priečný rez

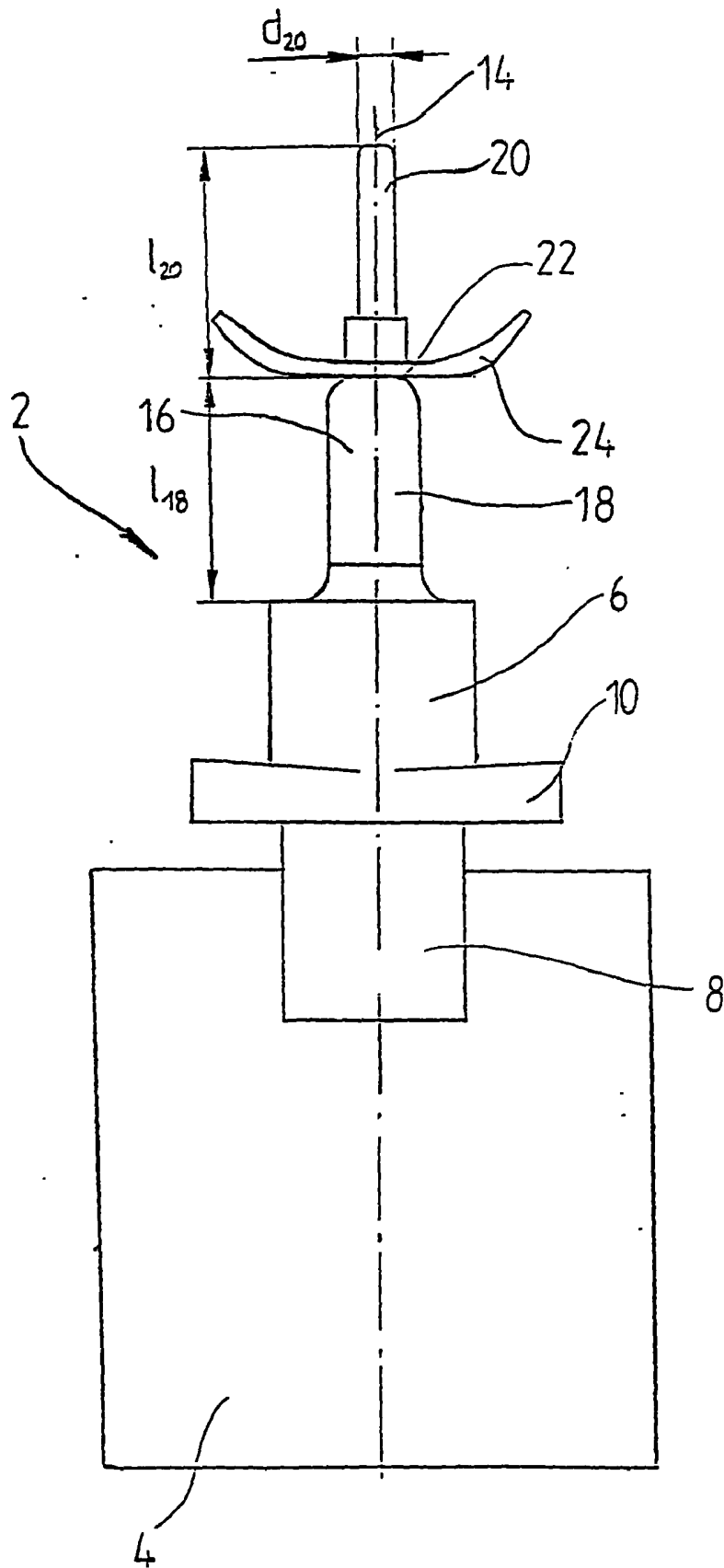
Pozdĺžny rez u srnky

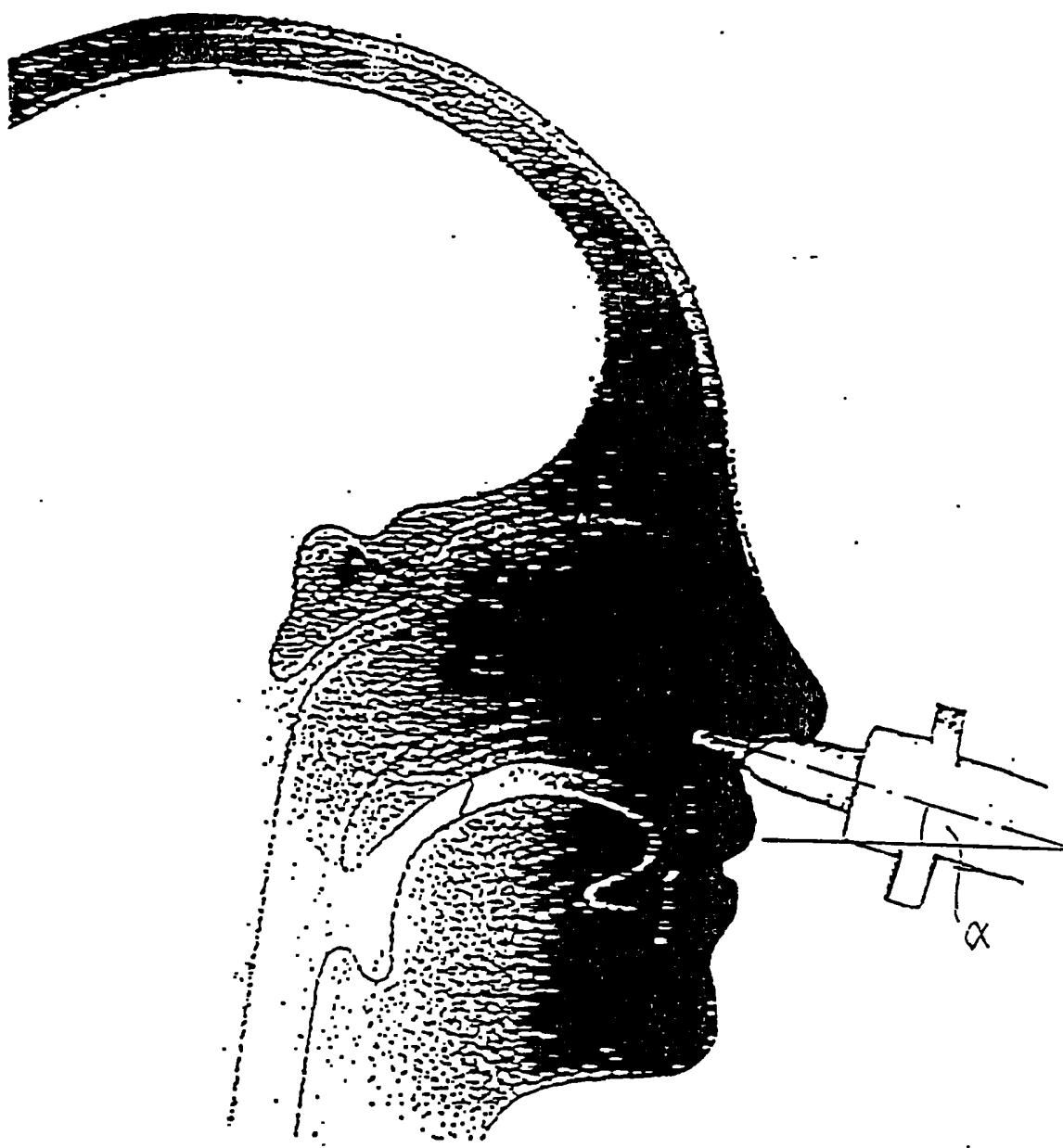
15.08.01



obr. 2

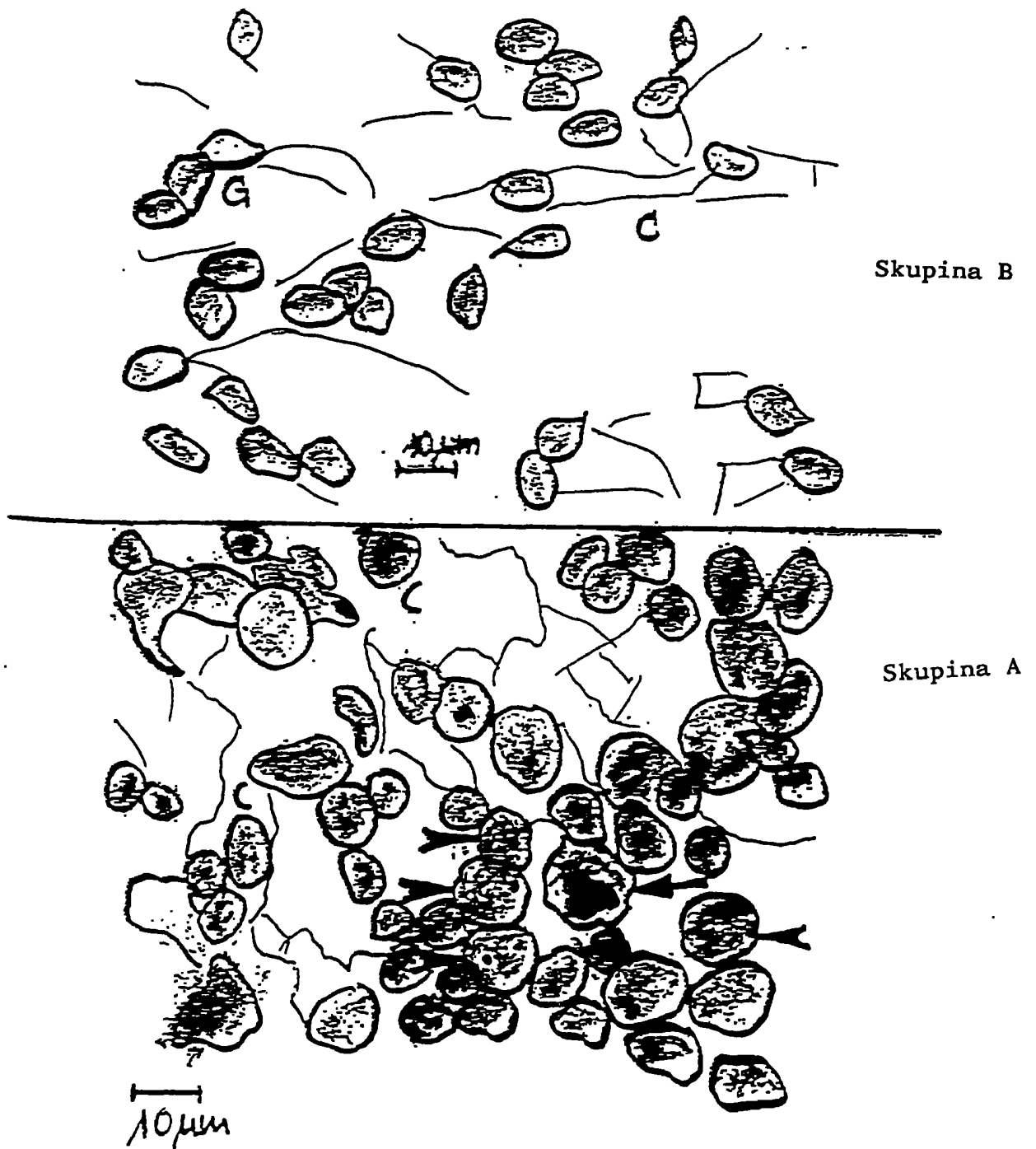
obr. 3





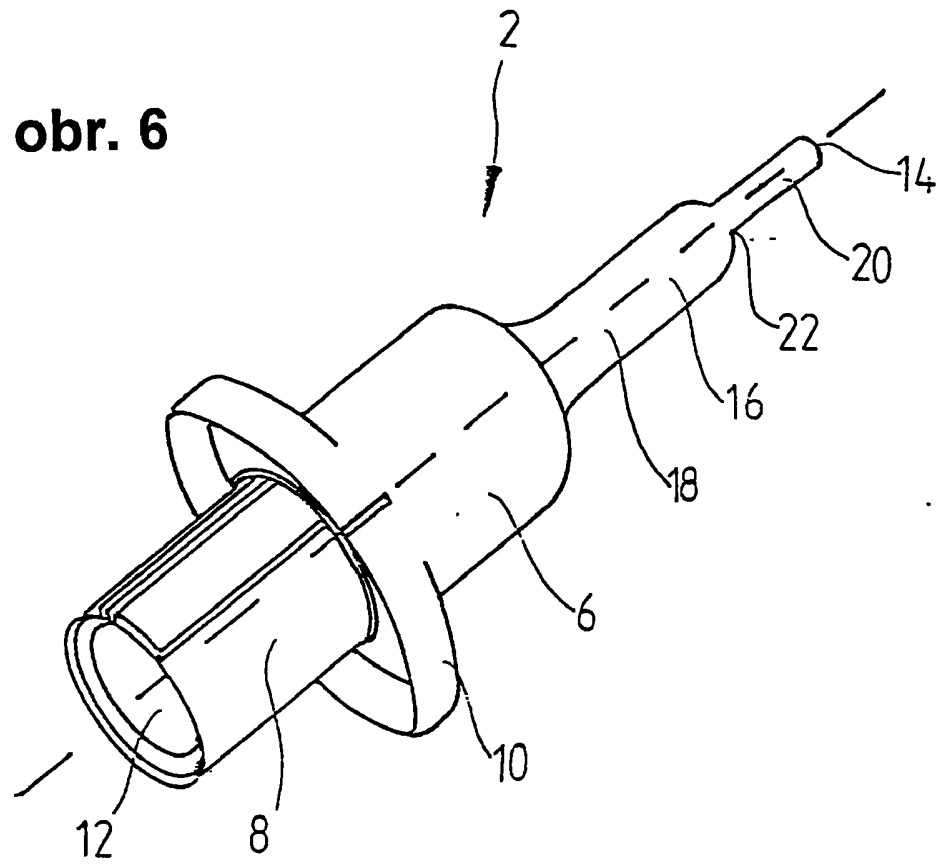
obr. 4

15.08.01

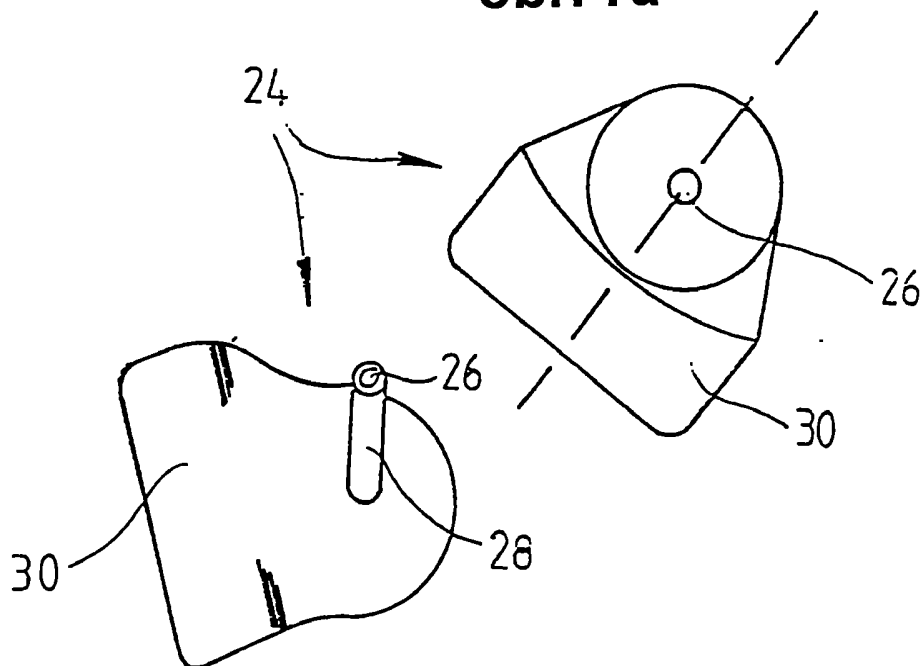


obr. 5

obr. 6



obr. 7a



obr. 7b