



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 768**

51 Int. Cl.:  
**A61M 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04077576 .9**

86 Fecha de presentación : **18.07.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1512429**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2005**

54 Título: **Agujas recubiertas con vacuna.**

30 Prioridad: **21.07.2000 GB 0017999**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2008**

73 Titular/es: **SmithKline Beecham Biologicals S.A.**  
**89 rue de l'Institut**  
**1330 Rixensart, BE**  
**SMITHKLINE BEECHAM plc.**

72 Inventor/es: **Dalton, Colin Clive;**  
**Easeman, Richard Lewis y**  
**Garcon, Nathalie**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 295 768 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

Agujas recubiertas con vacuna.

5 La presente invención se refiere a dispositivos eficaces para la administración de agentes farmacéuticos en la piel del cuerpo humano. En particular, la presente invención proporciona dispositivos para vacuna en la piel. La presente invención proporciona un dispositivo de liberación de un agente farmacéutico que tiene una parte perforadora de la piel que comprende un medio de depósito sólido que contiene el agente farmacéutico, en el que el medio de depósito reviste la parte perforadora de la piel. Como alternativa, la parte perforadora de la piel puede estar constituida por el medio de depósito sólido del agente farmacéutico. Los dispositivos de la presente invención son estables al almacenamiento y sólo liberan sustancialmente el producto farmacéutico después de que la parte perforadora haya penetrado en la piel. En una forma de realización preferida, se proporciona un dispositivo de microaguja recubierto externamente con el medio de depósito sólido que libera el agente farmacéutico directamente en la piel tras perforar el estrato córneo. Los dispositivos de liberación de agentes farmacéuticos se proporcionan de forma tal que libere el agente en capas definidas de la piel y los dispositivos de liberación preferidos comprenden partes perforadoras de la piel que liberan el agente farmacéutico en el epitelio o la dermis. Los medios depósito preferidos comprenden azúcares y, en particular azúcares estabilizantes que forman un vidrio tal como lactosa, rafinosa, trehalosa o sacarosa. Además, se proporcionan dispositivos de liberación de vacunas para la administración de vacunas en la piel, procedimientos para su fabricación y su uso en medicina.

20 La piel representa una barrera significativa frente a agentes externos. Una ilustración de la piel humana se proporciona en el Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 28ª edición. Desde las capas externas, hacia el interior, la piel está compuesta por el epitelio, que comprende el estrato córneo, el epitelio viable, y debajo del epitelio se encuentra la dermis. El epitelio está compuesto por cinco capas: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. El epitelio (incluidas las cinco capas) es la capa más externa y no vascular del la piel y tiene un espesor variable de entre 0,007 y 0,12 mm (70-120  $\mu\text{m}$ ). El epitelio está poblado por queratinocitos, un tipo celular que produce queratina y constituye el 95% de las células epidérmicas especializadas. El otro 5% de las células son melanocitos. Normalmente, la dermis subyacente se encuentra en un intervalo de 0,3 a aproximadamente 3 mm por debajo de la superficie del estrato córneo y contiene glándulas sudoríparas, folículos pilosos, terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos.

30 El estrato córneo domina la barrera de permeabilidad de la piel y está compuesto por algunas docenas de capas de epitelio queratinizado, córneo. Los estrechos intersticios entre los queratinocitos muertos o en fase de muerte en esta región están rellenos de multiláminas lipídicas cristalinas. Éstas sellan de un modo eficaz los intersticios entre la piel o el interior del cuerpo y el entorno al proporcionar una barrera hidrófoba a la entrada de moléculas hidrófilas. El estrato córneo tiene un espesor de 30-70  $\mu\text{m}$ .

35 Las células de Langerhans se encuentran a lo largo de toda la capa granular basal del epitelio (estrato espinoso y estrato granuloso), (Small Animal Dermatology, tercera edición, Muller-Kirk-Scott, Ed. Saunders (1983)) y se considera que desempeñan un papel importante en la defensa inicial del sistema inmunológico contra microorganismos invasores. Por tanto, esta capa de la piel representa una zona diana adecuada para ciertos tipos de vacunas.

45 Las vías de administración convencionales de agentes farmacéuticos en o a través de la piel, por lo general mediante agujas hipodérmicas y jeringas, están asociadas con numerosas desventajas. Tales desventajas incluyen dolor, el requerimiento de profesionales preparados para administrar el agente y también el riesgo que tiene el administrador de sufrir lesiones producidas por pinchazos con la aguja con el consiguiente riesgo de infección con una enfermedad de transmisión por sangre. Por ello, existe una necesidad de mejorar el procedimiento de administración de todos los tipos de productos farmacéuticos en o a través de la piel.

50 Se ha descrito una serie de enfoques alternativos para superar los problemas de la administración del agente a través del estrato córneo, incluidos varios diseños de parches cutáneos. Entre los ejemplos de parches cutáneos que liberan el agente a través de la piel sin que penetren físicamente en la capa del estrato córneo se incluyen los descritos en los documentos WO 98/20734 y WO 99/43350. Otros enfoques en los que no se perfora la piel físicamente incluyen electrotransporte o dispositivos iontoforéticos donde el paso del agente se estimula mediante la aplicación de una corriente eléctrica en la piel. Muchos de estos dispositivos se describen en la bibliografía (ejemplos de los cuales incluyen los documentos US 6.083.190; US6.057.374; US 5.995.869; US 5.622.530). Entre las desventajas potenciales de estos tipos de parches no penetrantes se incluyen la inducción de sensibilización significativa y molestias durante la administración del agente y la muy escasa captación del antígeno a través del estrato córneo intacto.

60 Se han descrito otros parches que implican la rotura física o la penetración de la piel. Se han descrito dispositivos que comprenden depósitos sólidos o líquidos que contienen agente y un parche con microcuchillas de metal en los que las microcuchillas cortan físicamente a través del estrato córneo para crear vías a través de las cuales el agente pueda entrar en el epitelio. Tales dispositivos se describen en los documentos WO 97/48440, WO 97/48442, WO 98/28037, WO 99/29298, WO 99/29364, WO 99/29365, WO 00/05339, WO 00/05166 y WO 00/16833. Otros dispositivos que implican la punción de la piel se incluyen en los documentos US 5.279.544, US 5.250.023 y US 3.964.482. Algunas de las desventajas de estos tipos de dispositivos surgen de las en general malas tasas de captación del agente en el tiempo de la administración, lo que da como resultado "tiempos de permanencia" prolongados durante los que las microcuchillas están en contacto con la piel. Para los propósitos de vacunación convencional, tiempos de permanencia

## ES 2 295 768 T3

mayores de aproximadamente quince a 30 minutos son relativamente poco deseables ya que prolongarían el periodo que se debería monitorizar la vacuna para detectar posibles efectos secundarios tales como choque anafiláctico. Además, es necesario transportar y/o almacenar muchos de los productos previamente descritos en espacios refrigerados. El mayor volumen de estos productos en comparación con los viales significa que se pueden almacenar menos dosis en los frigoríficos de los usuarios finales, lo que complica y encarece la logística.

En el documento WO 96/03978 se describen formas sólidas de dosificación que comprenden agentes farmacéuticos y un poliol estabilizante, tal como un azúcar, en las que las formas de dosificación están en forma de polvos y trocares.

La presente invención proporciona dispositivos mejorados que son estables durante su almacenamiento y son capaces de administrar y liberar el agente de forma eficaz en o a través de la piel. La invención se consigue proporcionando dispositivos de liberación de agentes farmacéuticos que tienen al menos un miembro perforador de la piel cargado con un medio de depósito biodegradable que contiene el agente que se va a liberar, siendo el miembro cargado perforador de la piel, como una aguja, lo bastante largo y lo bastante afilado como para perforar el estrato córneo de la piel. Una vez que el dispositivo de liberación del agente farmacéutico se ha administrado a la superficie de la piel y el miembro recubierto perforador de la piel o microaguja ha atravesado el estrato córneo, el medio de depósito se biodegrada, con lo que libera el agente en la piel situada por debajo del estrato córneo.

En una forma preferida de la presente invención se proporciona un dispositivo de liberación que tiene al menos un parte perforadora de la piel y un medio de depósito sólido que contiene el agente farmacéutico, en el que el medio de depósito reviste externamente la parte perforadora de la piel. Como alternativa, la parte perforadora de la piel puede estar compuesta de medio de depósito sólido del agente farmacéutico.

Los dispositivos de la presente invención pueden usarse para administrar cualquier agente a un paciente, al que se desee administrársele en un marco de tiempo corto de forma indolora sin los peligros y miedos que a menudo se asocian con las agujas y los dispositivos convencionales. Entre los ejemplos de tales agentes se incluyen los agentes cuya liberación debe ser diaria, tales como insulina, aunque también los agentes requeridos con menos frecuencia tales como vacunas o genes para la corrección de trastornos genéticos.

Los dispositivos de liberación de vacunas forman un aspecto preferido de la presente invención. En tales aplicaciones, el agente que se va a liberar es un antígeno o varios antígenos y puede comprender microorganismos o virus (vivos, atenuados o muertos) o vectores con genes o ácidos nucleicos (por ejemplo, adenovirus, retrovirus), un antígeno derivado de un patógeno (tal como una subunidad, partícula, partícula similar a un virus, proteína, péptido, polisacárido o ácido nucleico) o puede ser un autoantígeno en el caso de una vacuna contra el cáncer u otro autoantígeno asociado con un trastorno crónico no infeccioso, no canceroso tal como alergia. El agente puede ser un antígeno o un ácido nucleico solo o puede también comprender un adyuvante u otro estimulante para mejorar y/o dirigir la respuesta inmunológica, y también puede además comprender excipientes farmacéuticamente aceptables. Los dispositivos recubiertos de vacuna pueden usarse para la vacunación profiláctica o terapéutica y para iniciar y/o reforzar la respuesta inmunológica. en los casos de vacunación terapéutica en los que es necesario romper la tolerancia, se pueden usar los parches recubiertos con vacuna como parte de un régimen específico tal como un primer estímulo. Ciertas realizaciones del dispositivo descrito en este documento tienen también la ventaja significativa de poder almacenarse a temperatura ambiente, reduciendo de esta manera los costes logísticos y liberando un espacio valioso del refrigerador para otros productos.

Los dispositivos de suministro de la presente invención se pueden usar para una amplia variedad de agentes farmacéuticos que no se pueden administrar con facilidad con los parches de no penetración convencionales (como moléculas hidrófilas) en ausencia de estimuladores de la penetración.

Las protuberancias perforadoras de la piel que pueden recubrirse con medio de depósito para formar los dispositivos de liberación preferidos de la presente invención pueden estar hechas de casi cualquier material que se pueda usar para crear una protuberancia lo bastante fuerte como para perforar el estrato córneo y que sea seguro para el propósito, por ejemplo, las protuberancias pueden estar hechas de metal, tal como acero inoxidable de grado farmacéutico, oro o titanio u otro metal como los usados en las prótesis, aleaciones de estos y otros metales; cerámicas, semiconductores, silicio, polímeros, plásticos, cristales o compuestos.

En general, el parche comprende una placa de soporte de la que depende una pluralidad de protuberancias perforadoras tales como microagujas o microcuchillas. Las propias protuberancias perforadoras pueden tomar muchas formas, y pueden ser sólidas o huecas, y como tales pueden estar en forma de una aguja o cuchilla sólida (tales como los aspectos en microcuchilla y los diseños descritos por McAllister y col., Annu. Rev. Biomed. Eng., 2000, 2, 289-313; Henry y col., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, 8, 922-925; Kuashik y col., Anesth. Analg., 2001, 92, 502-504; McAllister y col., Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 26 (1999), Controlled Release Society, Inc., 192-193; en los documentos WO 99/64580; WO 97/48440; WO 97/48442; WO 98/28037; WO 99/29364; WO 99/29365; US 5.879.326). Como alternativa, las protuberancias perforadoras pueden estar en forma de una microaguja con una perforación central hueca. En esta última forma de realización, la perforación central puede extenderse a través de la aguja formando un canal que comunica con ambos lados del miembro con la microcuchilla (EP 0 796 128 B1). Se prefieren microagujas y microcuchillas sólidas.

## ES 2 295 768 T3

La longitud del miembro perforador de la piel típicamente se encuentra entre 1  $\mu\text{m}$  a 1 mm, preferiblemente entre 50  $\mu\text{m}$  y 600  $\mu\text{m}$ , y más preferiblemente entre 100 y 400  $\mu\text{m}$ . La longitud del miembro perforador de la piel puede seleccionarse según el sitio escogido para dirigir la liberación del agente, en concreto, preferiblemente la dermis, y más preferiblemente la epidermis. Los miembros perforadores de la piel de los dispositivos de la presente invención pueden  
5 tomar la forma de, y fabricarse según los procedimientos descritos en los documentos US 5.879.326, WO 97/48440, WO 97/48442, WO 98/28037, WO 99/29298, WO 99/29364, WO 99/29365, WO 99/64580, WO 00/05339, WO 00/05166 o WO 00/16833; o en McAllister y col., Annu. Rev. Biomed. Engl., 2000, 2, 289-313; Henry y col., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, 8, 922-925; Kaushik y col., Anesth. Analg., 2001, 92, 502-504; McAllister y col., Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 26, (1999), Controlled Release Society, Inc., 192-193.

10 Los dispositivos con microcuchillas más preferidos para revestir/recubrir con el medio de depósito con agente farmacéutico para formar dispositivos de la presente invención se describen WO 99/48440 y Henry y col., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, 8, 922-925.

15 Los dispositivos de la presente invención preferiblemente comprenden una pluralidad de miembros perforadores de la piel, preferiblemente de hasta 1000 miembros por dispositivo, más preferiblemente de hasta 500 miembros perforadores de la piel por dispositivo.

20 Cuando la protuberancia perforadora es sólida, puede ser plana (denominada microcuchilla, véase la figura 1) o puede tener una sección transversal circular o poligonal (véase la figura 5). Las protuberancias pueden tener una sección transversal de ejes rectos o en forma ahusada y pueden ser planas o circulares, o de otra forma poligonal. Por ejemplo, las microcuchillas pueden tener una hoja curva (figura 3) o estar formadas en una ranura de sección en V (Figura 6). Como alternativa, las protuberancias pueden tener formas más complejas para aumentar la adherencia y la dinámica del fluido tal como la estrella de cinco puntas que se muestra en la figura 7.

25 Los miembros perforadores de la piel pueden estar integrados en la placa de soporte o pueden estar unidos a ella. Cuando las protuberancias están unidas a la placa, la protuberancia perforadora puede estar formada por el medio de depósito. Tales dispositivos pueden formarse estirando o extruyendo un medio de depósito fundido que contiene el agente por puntos pequeños. Por ejemplo, el medio de depósito fundido podía verterse directamente en una placa de  
30 soporte a través de una cabeza con múltiples poros, tras lo que el extruido caliente se enfría y se adhiere a la placa. Cuando se saca el extruido se forma una serie de extremos puntiagudos.

35 Como característica general de cualquier forma de la protuberancia perforadora, para mejorar la adherencia del depósito tras el recubrimiento, la superficie de protuberancia puede texturarse. Por ejemplo, la superficie puede estar áspera, granulada, rizada o acanalada. Además, las microcuchillas sólidas pueden comprender además orificios (véase la figura 4) de forma que el depósito pueda drenar en su interior y crear un nudo en el depósito, para mantener el depósito encima de la cuchilla de un modo más seguro. En ciertas formas de realización, incluidas las formulaciones altamente solubles y liofilizadas friables, se prefiere que el depósito friable pueda mantenerse en su totalidad en el interior de tales orificios de forma que queden protegidos de su rotura durante la punción de la piel.

40 En una forma de realización alternativa, las protuberancias perforadoras pueden ser separables del miembro base. Por ejemplo, en la forma de realización en la que las protuberancias perforadoras (o al menos las puntas de las mismas) son el propio depósito, tras la penetración de la piel la protuberancia perforadora se separa del soporte base, lo que permite la retirada del parche de la piel mientras que deja el depósito atrás, en la piel. La separación del depósito de la  
45 placa de soporte puede realizarse mediante cizalladura física o por biodegradación de parte de las agujas adyacentes a la placa de soporte.

50 Una forma de realización de esto puede ser soltar las puntas de microprotusión de un medio de depósito de disacárido relativamente poco soluble (que contienen una dispersión del agente que se va a liberar) y después soltar la porción restante de la microprotuberancia y la placa de soporte de un material soluble con relativa facilidad. Una vez que se ha insertado en la piel, el eje de microprotuberancia soluble con relativa facilidad se degradaría, lo que permite la retirada del parche de la piel, dejando atrás las puntas en la piel. Las puntas que quedan en la piel pueden liberar lentamente el agente mediante una biodegradación más lenta.

55 De acuerdo con esto, en una forma de realización preferida de la presente invención se proporciona un parche cutáneo para la liberación de agentes farmacéuticos o vacunas que comprenden una matriz de microcuchillas o microagujas recubiertas con un medio de depósito biodegradable sólido que contienen el agente farmacéutico o la vacuna.

60 El depósito del agente biodegradable puede ser cualquiera hecho de cualquier medio que cumpla la función requerida para la presente invención. El depósito debe ser capaz de adherirse a la microprotuberancia lo bastante como para que el depósito permanezca físicamente estable y unido durante el almacenamiento prolongado y también que se mantenga lo bastante intacto durante el procedimiento de administración cuando la microprotuberancia recubierta perfora el estrato córneo. El depósito también debe ser capaz de mantener o contener una suspensión o una solución del agente que se va a liberar en cualquier forma seca o parcialmente seca, que se libera en la piel durante la biodegradación del  
65 medio de depósito.

La biodegradación del medio en el sentido de la presente invención significa que el medio de depósito cambia de estado, de forma que cambia desde su estado de no liberación a su estado de liberación en el que el agente entra

## ES 2 295 768 T3

en la piel. La liberación del agente activo puede implicar uno o más procedimientos físicos y/o químicos tales como hidratación, difusión, transición de fase, cristalización, disolución, reacción enzimática y/o reacción química. En función de la elección del medio de depósito, la biodegradación se puede inducir mediante uno o más de los siguientes: agua, fluidos corporales, humedad, temperatura corporal, enzimas, catalizadores y/o reactivos. Por tanto, el cambio del medio de depósito puede inducirse mediante hidratación y calentamiento asociados con las mayores humedad y temperatura de la piel. Después, el medio de depósito se puede degradar mediante disolución y/o esponjamiento y/o cambio de fase (cristalina o amorfa), de este modo desintegrando o simplemente incrementando la permeabilidad del medio.

Preferiblemente, el medio se disuelve y se metaboliza o expele o excreta del cuerpo, aunque el depósito puede, como alternativa, permanecer unido al miembro perforador de la piel para retirarse de la piel cuando se retire el dispositivo. Se prefiere la liberación del agente mediante disolución del medio de depósito.

Entre los ejemplos de los medios de depósito adecuados se incluyen, aunque no se limitan a ellos, polioles tales como azúcares, polisacáridos, polioles sustituidos tales como hidratos de carbono hidrofóbicamente derivatizados, aminoácidos, polímeros o copolímeros biodegradables tales como poli(hidroxiácidos), polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico) y poli(lactida-co-caprolactona) o polilactida co-glicolida. El recubrimiento de las microcuchillas puede estar en estado amorfo o cristalino y también puede ser parcialmente amorfo y parcialmente cristalino.

Los medios de depósito particularmente preferidos son aquéllos que estabilizan el agente que se va a liberar durante el periodo de almacenamiento. Por ejemplo, un antígeno o un agente disuelto o disperso en un vidrio de poliol o simplemente secado en un poliol es estable al almacenamiento durante periodos prolongados de tiempo (documentos US 5.098.893, US 6.071.428; WO 98/16205; WO 96/05809; WO 96/03978; US 4.891.319; US 5.621.094; WO 96/33744). Tales polioles forman el conjunto preferido de medios de depósito.

Entre los polioles preferidos se incluyen azúcares, incluidos mono, di, tri u oligosacáridos y sus correspondientes alcoholes de azúcar. En la técnica se conocen bien los azúcares adecuados para usar en la presente invención e incluyen trehalosa, sacarosa, lactosa, fructosa, galactosa, manosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa, maltosa o dextrosa y alcoholes de azúcar de las mencionadas anteriormente tales como manitol, lactitol y maltitol. Se prefieren sacarosa, lactosa, rafinosa y trehalosa.

Es preferible que el medio de depósito forme un vidrio amorfo tras el secado. El depósito vítreo puede tener cualquier temperatura de transición vítreo, aunque preferiblemente tiene una temperatura de transición vítreo que estabiliza el agente farmacéutico durante el almacenamiento y también facilita la liberación rápida del agente tras la inserción del depósito en la piel. En consecuencia, la temperatura de transición vítreo es superior a 30-40°C, aunque más preferiblemente es aproximadamente la temperatura corporal (tal como, aunque no limitada a ella, 37-50°C).

Los medios de depósito preferidos usados para moldear los miembros perforadores de la piel de los dispositivos son aquéllos que liberan el agente farmacéutico en un corto periodo de tiempo. Las formulaciones de depósito preferidas liberan sustancialmente todo el agente en 5 minutos, más preferiblemente en 2 minutos, más preferiblemente en 1 minuto, y más preferiblemente en 30 segundos de la inserción en la piel. Tales depósitos de liberación rápida se pueden conseguir, por ejemplo, mediante finos recubrimientos de depósitos cristalinos amorfos, particularmente depósitos cristalinos de disolución/esponjamiento rápido con temperaturas de transición vítreo bajas. Para el experto en la técnica estará claro que una temperatura de transición vítreo baja se puede conseguir mediante la selección del azúcar formador de cristal adecuado y/o el incremento de la humedad y/o la fuerza iónica del cristal. Además, también se puede conseguir una mayor velocidad de disolución de los depósitos cristalinos mediante el calentamiento del dispositivo antes o durante la aplicación a la piel.

Entre otros excipientes adecuados que pueden incluirse en la formulación se incluyen tampones, aminoácidos, inhibidores del cambio de fase ("contaminantes del cristal") que se pueden añadir para prevenir el cambio de fase del recubrimiento durante el procesamiento o el almacenamiento, o inhibidores para prevenir las reacciones químicas perjudiciales durante el procesamiento o el almacenamiento tales como los inhibidores de la reacción de Maillard como aminoácidos.

En consecuencia, en una forma de realización preferida de la presente invención se proporciona un parche cutáneo para el suministro de vacunas que comprenden una matriz de microcuchillas o microagujas recubiertas con un medio de depósito de azúcar vítreo que contiene la vacuna.

Preferiblemente, el medio de depósito es de una solución sólida o extremadamente viscosa, que pueda ser lisa o texturada. Por ejemplo, el medio puede ser sólido, cristalino, amorfo/vítreo, solución sólida, suspensión sólida, poroso, liso, áspero o rugoso.

Preferiblemente, las formulaciones que comprenden el agente que se va a suministrar y el medio de depósito biodegradable se mezclan en solución acuosa y después se secan en el miembro de microprotuberancia o la formulación podría fundirse y después aplicarse al miembro de microprotuberancia. Un procedimiento preferido para recubrir los miembros perforadores de la piel comprende preparar una solución acuosa de antígeno de la vacuna y un poliol hidrosoluble (tal como trehalosa), seguido por el recubrimiento de la solución encima de las microcuchillas mediante la

## ES 2 295 768 T3

inmersión del miembro en la solución una o más veces, seguido por el secado a temperatura ambiente o liofilización para dar un recubrimiento poroso (repetiendo el procedimiento en parte o totalmente para conseguir el espesor del recubrimiento deseado, véase la figura 2, para una microcuchilla recubierta (siendo la zona de puntos el medio de depósito, las líneas discontinuas muestran que el medio de depósito puede cubrir la totalidad de la zona por debajo de la superficie del miembro con la microcuchilla)). En este procedimiento se prefiere que la solución inicial de poliol o azúcar hidrosoluble sea viscosa, tal como la viscosidad conseguida con 40% de azúcar.

En una forma de realización en la que las microagujas tienen perforaciones centrales huecas (figura 5A) o las microcuchillas son curvas o tienen una sección en V (figuras 3 y 6), una vez que la cuchilla se ha sumergido en el medio líquido, la solución líquida subirá y llenará la perforación o los espacios internos por acción capilar (para una microaguja con una perforación central tras cargarla con un medio de depósito, véase la figura 5B).

Como alternativa, en las cuchillas se pueden pulverizar de forma individual diminutos volúmenes en picolitros de la solución o la formulación fundida mediante tecnología usada de forma habitual en la técnica de la impresión de inyección de tinta, seguido por secado. Un procedimiento alternativo consistiría en preparar microesferas, micropartículas o polvos de formulación amorfa que contengan polioles tales como azúcar, usando técnicas conocidas en la materia (tales como secado por pulverización o secado por congelación de pulverización) por pulverización o secado y trituración) y mediante el control del contenido de humedad para conseguir una temperatura de transición vítrea relativamente baja (por ejemplo de 30°C), seguido por pulverización o inmersión para poner las microesferas o las micropartículas o los polvos en contacto con un miembro de microprotuberancia calentado hasta una temperatura por encima de la temperatura de transición vítrea de la microesfera (por ejemplo a 45°C). A continuación, las partículas recubiertas se fundirían y pegarían al miembro de microprotuberancia y después se secarían o el miembro con la microcuchilla se secaría después (para eliminar el contenido en humedad residual), lo que aumentaría la temperatura de transición vítrea del medio de depósito adecuada para almacenamiento.

Como alternativa, el miembro con microaguja puede recubrirse mediante una técnica de recubrimiento por congelación. Por ejemplo, la temperatura del miembro con microaguja puede reducirse por debajo del punto de congelación del agua (por ejemplo mediante inmersión en nitrógeno líquido) y después las soluciones acuosas del medio de depósito y el agente pueden pulverizarse en las microagujas frías, o la microcuchilla puede sumergirse en la solución del agente. De este modo, el agente y el medio de depósito se adhieren rápidamente al miembro con la microaguja, que a continuación se puede sublimar mediante liofilización o evaporar a temperaturas más elevadas, para secar el recubrimiento del depósito.

Otro procedimiento para recubrir los miembros con microaguja es sumergir las microagujas en un disolvente, como agua (que opcionalmente comprende un tensioactivo para garantizar un buen contacto), después sumergir las cuchillas mojadas en forma de polvo del medio de depósito que sea soluble en disolvente, seguido por secado para eliminar el disolvente.

En una forma de realización preferida de la invención se proporciona un procedimiento para recubrir una microcuchilla con una solución viscosa del medio formador de depósito que sea lo bastante fluida como para permitir la filtración estéril a través de una membrana de poros de 220 nm. Por tanto, se proporciona una formulación de vacuna que comprende un antígeno en una formulación de solución de azúcar viscosa filtrable. Son ejemplos preferidos de tales soluciones de azúcar viscosas filtrables las soluciones con entre aproximadamente el 20 a aproximadamente el 50% de azúcar (peso/volumen de la formulación de vacuna final antes del sacado). Más preferiblemente, las soluciones de azúcar viscosas filtrables se encuentran en el intervalo de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 45% de azúcar y más preferible tienen aproximadamente un 40% (peso/volumen de la formulación de vacuna final antes del secado). En este contexto, las soluciones de azúcar más preferidas comprenden sacarosa, rafinosa, trehalosa o lactosa.

En la forma de realización en la que las microcuchillas comprenden orificios integrados para dosificación, las series de microcuchillas (como una cuchilla de sierra para metales) que comprendan cuchillas individuales como la que se muestra en la figura 4, pueden llenarse con el depósito y secarse, antes de ensamblarla en un parche. En el documento WO 99/29364 se describe uno de tales dispositivos ensamblado a partir de varias series de cuchillas. Como alternativa, los dispositivos como los que se describen en el documento WO 97/48440 pueden comprender orificios integrados, que pueden llenarse mientras las cuchillas todavía están en el plano de la placa base grabada, seguido por la introducción por perforación de las cuchillas en la alineación perpendicular con el medio de depósito *in situ*.

Usando estas técnicas, cada miembro perforador de la piel puede cargarse con cantidades relativamente elevadas del agente farmacéutico. Preferiblemente cada miembro perforador se carga con hasta 500 ng de agente farmacéutico o antígeno, más preferiblemente con hasta 1 µg de agente farmacéutico o antígeno y más preferiblemente con hasta 5 µg de agente farmacéutico o antígeno.

Preferiblemente, las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o una composición antigénica capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra un patógeno humano, en la que el antígeno o la composición antigénica deriva de VIH-1 (tal como tat, nef, gp120 o gp160), virus del herpes zoster, tal como gD o derivados de la misma o proteína temprana inmediata tal como ICP27 de los virus HSV1 o HSV2, citomegalovirus (especie humana) (tal como gB o derivados de la misma), rotavirus (incluidos virus vivos atenuados), virus de Epstein Barr (tales como gp350 o sus derivados), virus Varicella Zoster (tal como gpI, II e IE63) o de un virus de hepatitis como el virus de la hepatitis B (por ejemplo el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un derivado del mismo),

el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis E, o de otros patógenos virales tales como paramixovirus: virus respiratorio sincitial (tal como las proteínas F o G o derivados de las mismas), el virus de paragripal, el virus del sarampión, el virus de las paperas, los virus del papiloma humano (por ejemplo HP6, 11, 16, 18, ...), los flavivirus (por ejemplo el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, el virus de la encefalitis japonesa) o el virus de la gripe (virus enteros o inactivados, virus SPLIT de la gripe, cultivados en huevos o en células MDCK o células Vero o virosomas enteros de la gripe (como describen R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como las proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas), o deriva de patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp.*, incluidas *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de unión a la transferrina, proteínas de unión a la lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluidas *M. catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo adhesinas de alto y bajo peso molecular e invasinas); *Bordetella spp.*, incluidos *B. pertussis* (por ejemplo perctactina, toxina pertussis o derivados de las mismas, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluidas *M. tuberculosis* (por ejemplo ESAT6, antígeno 85A, -B o -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluidas *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluida *E. coli enterotóxica* (por ejemplo factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogénica (por ejemplo la toxina similar a la toxina shinga o derivados de la misma); *Vibrio spp.*, incluidos *V. cholera* (por ejemplo, la toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella spp.*, incluidas *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluidas *Y. enterocolitica* (por ejemplo la proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluidas *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluidas *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluidos *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluidas *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolante); *Pseudomonas spp.*, incluidas *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluidos *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluidos *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluidos *C. tetani* (por ejemplo, la toxina del tétanos y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo la toxina botulínica y derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplo las toxinas de clostridium A o B y derivados de las mismas); *Bacillus spp.*, incluidas *B. anthracis* (por ejemplo la toxina botulínica y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluidas *C. diphtheriae* (por ejemplo la toxina diftérica y derivados de la misma); *Borrelia spp.*, incluidas *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluidas *E. equi* y el agente de la Erliquiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluidas *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a la heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a la heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluidas *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluidos *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas raras de la membrana externa), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; o deriva de parásitos tales como *Plasmodium spp.*, incluidos *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluidos *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluidos *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluidos *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluido *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluida *G. lamblia*; *Leishmania spp.*, incluida *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluida *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluida *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluida *S. mansoni*, o deriva de levaduras tales como *Candida spp.*, incluida *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluida *C. neoformans*.

Las vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Streptococcus spp.*, incluidos *S. pneumoniae* (por ejemplo polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a lisina) y el antígeno proteico neumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins y col., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342) y sus derivados destoxificados mutantes (documentos WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluidos *H. influenzae tipo B* (por ejemplo PRP y sus conjugados), *H. influenzae* no tipificables, por ejemplo OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de fimbria (documento US 5.843.464) o variantes de múltiples copias o proteínas de fusión de las mismas. Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Moraxella catarrhalis* (incluidas las vesículas de membrana de la misma, OMP106 (documento WO 97/41731)) y de *Neisseria meningitidis B* (incluidas sus vesículas de la membrana externa y NspA (documento WO 96/29412).

En la técnica se conocen bien los derivados del antígeno de superficie de la hepatitis B e incluyen, entre otros, los antígenos PreS1, PreS2 que se describen en las solicitudes de patente europea EP-A-414374; EP-A-0304578 y EP 198-474. En un aspecto preferido la formulación de la vacuna de la invención comprende el antígeno VIH-1, la gp120, especialmente cuando se expresan en las células CHO. En otra forma de realización, la formulación de la vacuna de la invención comprende gD2t como se ha definido anteriormente en este documento.

En una forma de realización preferida de la presente invención, las vacunas que contienen el adyuvante reivindicados comprenden antígeno derivado del virus del papiloma humano (VPH) considerado como el responsable de las verrugas genitales, (VPH 6 o VPH 11 y otros) y los virus VPH responsables del cáncer cervical (VPS16, VPH18 y otros).

Formas particularmente preferidas de vacunas profilácticas, o terapéuticas, de las verrugas genitales comprenden partículas L1 o capsómeros, y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de las proteínas de los VPS 6 y VPH 11 E6, E7 y L2.

## ES 2 295 768 T3

Las formas más preferidas de proteína de fusión son: L2E7 como se ha descrito en el documento WO 96/26277 y la proteína D(1/3)-E7 descrita en el documento GB 9717953.5 (PCT/EP 98/05285).

Una composición, vacuna profiláctica o terapéutica, preferida contra la infección o el cáncer cervical por VPH puede comprender antígenos de los virus VPH 16 o 18. Por ejemplo, monómeros antigénicos L1 o L2 o antígenos L1 o L2 presentados juntos como una partícula de tipo virus (VLP) o la proteína L1 sola presentada sola en una VLP o una estructura capsomérica. Tales antígenos, partículas de tipo virus y capsómeros se conocen por sí mismos en la técnica. Véase por ejemplo los documentos WO 94/00152, WO 94/20137, WO 94/05792 y WO 93/02184.

Otras proteínas tempranas se pueden incluir solas o como proteínas de fusión tales como, por ejemplo, preferiblemente, E7, E2 o E5; formas de realización particularmente preferidas de esto incluyen una VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (documento 96/11272).

Antígenos del VPH16 particularmente preferidos comprenden las proteínas tempranas E6 o E7 fusionadas con un vehículo de proteína D para formar fusiones de Proteína D-E6 o E7 del VPH 16, o combinaciones de las mismas; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (documento WO 96/26277).

Como alternativa, las proteínas tempranas E6 y E7 de los virus VPH 16 o 18 pueden presentarse en una única molécula, preferiblemente una fusión proteína D-E6/E7. Tales vacunas pueden contener opcionalmente las proteínas E6 y E7, o ambas del virus VPS 18, preferiblemente en la forma de una proteína de fusión proteína D-E6 o proteína D-E7 o proteína D-E6/E7. La vacuna de la presente invención puede además comprender antígenos de otras cepas de VPH, preferiblemente de las cepas VPH 6, 11, 31, 33 o 45.

Las vacunas de la presente invención además comprenden antígenos derivados de parásitos que causan malaria. Por ejemplo, los antígenos preferidos de *Plasmodia falciparum* incluyen RTS,S y TRAP. La RTS es una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la porción del extremo C de la proteína circumsporozoíto (CS) de *P. falciparum* unida a través de cuatro aminoácidos de la porción preS2 del antígeno de superficie de la hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de la hepatitis B. Su estructura completa se describe en la solicitud de patente internacional N° PCT/EP92/02591, publicada con el número de documento WO 93/10152 que reivindica prioridad de la solicitud de patente de RU N° 9124390.7. Cuando se expresa en levaduras, la RTS se produce como partícula lipoproteica y cuando se coexpresa con el antígeno S del VHB produce una partícula mixta conocida como RTS,S. Los antígenos TRAP se describen en la solicitud de patente internacional N° PCT/GB8/00895, publicada como documento WO 90/01496. Una forma de realización preferida de la presente invención antigénica es una vacuna contra la malaria en la que la preparación antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros antígenos de plasmodio que son candidatos probables a componentes de una vacuna contra la malaria en múltiples etapas son MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.*

Las formulaciones también pueden contener un antígeno anticanceroso y ser útiles para cánceres de tratamiento inmunoterapéutico. Por ejemplo, la formulación adyuvante encuentra utilidad con los antígenos de rechazo tumoral tales como los de los cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmonar, pancreático, renal o melanoma. Entre los ejemplos de antígenos se incluyen MAGE 1 Y MAGE 3 u otros antígenos MAGE para el tratamiento de melanoma, PRAME, BAGE o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, páginas 628-6363; Van der Eynde y col., International Journal of Clinical & Laboratory Research (sometido en 1997); Correale y col. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, página 293. De hecho, estos antígenos se expresan en un amplio abanico de tipos de tumores tales como melanomas, carcinoma pulmonar, sarcoma y carcinoma de vejiga. Otros antígenos específicos de tumor son adecuados para usar con un adyuvante de la presente invención e incluyen, pero no se restringen a ellos, antígeno específico de próstata (PSA) o Her-2/neu, KSA (GA733), MUC-1 y antígeno carcinoembrionario (CEA). De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna que comprende una composición adyuvante según la invención y un antígeno de rechazo tumoral.

Además, dicho antígeno puede ser una hormona peptídica propia tal como la hormona liberadora de hormona gonadotropina de longitud total (GnRH, documento WO 95/20600), un pequeño péptido de 10 aminoácidos, en el tratamiento de muchos cánceres, o en la inmunocastración.

Se prevé que las composiciones de la presente invención se usarán para formular vacunas que contengan antígenos derivados de *Borrelia sp.* Por ejemplo, los antígenos pueden incluir ácido nucleico, antígeno o preparaciones antigénicas derivadas de patógenos, proteínas o péptidos producidos de forma recombinante y proteínas de fusión quiméricas. En particular, el antígeno es OspA. El OspA puede ser una proteína madura completa en una forma lipídada en virtud de la célula huésped (*E. coli*) denominada (Lipo-OspA) o un derivado no lipídado. Entre tales derivados no lipídados se incluyen la proteína de fusión no lipídada NS1-OspA que tiene los primeros 81 aminoácidos del extremo N de la proteína no estructural (NS1) del virus de la gripe y la proteína OspA completa, y otra, MDP-OspA, es una forma no lipídada de OspA que porta 3 aminoácidos adicionales en el extremo N. Las vacunas de la presente invención pueden usarse para la profilaxis o el tratamiento de la alergia. Tales vacunas comprenderían antígenos específicos de alérgeno (por ejemplo Der p1) y no específicos de alérgenos (por ejemplo péptidos derivados de la IgE humana, incluido, pero no restringido a este, el decapeptido stanworth (documento EP 0 477 231 B1).

## ES 2 295 768 T3

Se prevé que las composiciones de la presente invención se usarán para formular vacunas que contengan antígenos derivados de una amplia variedad de fuentes. Por ejemplo, los antígenos pueden incluir ácido nucleico humano, bacteriano o viral, antígeno o preparaciones antigénicas derivados de patógenos, antígeno o preparaciones antigénicas derivados de tumores, antígenos derivados del huésped, incluidos péptidos de GnRH y de IgE, proteínas o péptidos producidos de forma recombinante y proteínas de fusión quiméricas.

Además, en las composiciones en la presente invención se pueden incluir ácidos nucleicos en forma desnuda o incorporados en un vector adecuado tal como un adenovirus o un retrovirus para facilitar la incorporación de los ácidos nucleicos en las células de la piel tras la aplicación. Entre las aplicaciones de esta forma de realización se incluyen vacunas con ADN y productos de terapia génica.

Se conoce el suministro de genes basada en plásmidos, en particular con propósitos de inmunización o tratamiento génico. Por ejemplo, la administración de ADN desnudo mediante la inyección en músculo de ratón se esboza en el documento WO 90/11092. Johnston y col. en el documento WO 91/07487 describen procedimientos para transferir un gen a células de vertebrados mediante el uso de microproyectiles que se han recubierto con un polinucleótido que codifica un gen de interés, y mediante la aceleración de micropartículas tales que las micropartículas pueden penetrar en a célula diana.

Las vacunas con ADN normalmente están compuestas por un vector plasmídico bacteriano en el que se inserta un promotor viral fuerte, el gen de interés que codifica un péptido antigénico y secuencias de poliadenilación/terminación de la transcripción. El gen de interés puede codificar una proteína completa o simplemente una secuencia peptídica antigénica relacionada con el patógeno, el tumor u otro agente contra el que se pretenda proteger. El plásmido puede crecer en bacterias, tales como por ejemplo *E. coli*. y después aislarse y prepararse en un medio adecuado, en función de la vía de administración pretendida, antes de administrarlo al huésped. Tras la administración, las células del huésped captan el plásmido donde la proteína o el péptido se produce. Preferiblemente, el vector plasmídico se preparará sin origen de replicación que sea funcional en células eucarióticas, para prevenir la replicación plasmídica en el huésped mamífero y su integración en el ADN cromosómico del animal implicado. La información en relación a la vacunación con ADN se proporciona en Donnelly y col. "DNA vaccines" *Ann. Rev. Immunol.* 1997 15: 617-648.

En una forma de realización de la invención, se administra/suministra un polinucleótido como ADN "desnudo", por ejemplo como se describe en Ulmer y col., *Science* 259: 1745-1749, 1993 y se revisa en Cohen, *Science* 259: 1691-1692, 1993. La captación de ADN desnudo puede incrementarse mediante el recubrimiento de ADN encima de las perlas metálicas inertes, tales como perlas de oro o biodegradables, que se transportan con eficacia en las células; o mediante el uso de otros agentes facilitadores de la transfección bien conocidos, tales como fosfato cálcico.

El ADN puede administrarse junto con un vehículo tal como, por ejemplo, liposomas, estando todo atrapado en el medio de depósito. Típicamente, tales liposomas son catiónicos, por ejemplo derivados de imidazolio (documento WO 95/14380), derivados de guanidina (documento WO 95/14381), derivados de fosfatidil colina (documento WO 95/35301), derivados de piperazina (documento WO 95/14651) y derivados de biguanida.

Las vacunas de la presente invención pueden, de forma ventajosa, también incluir un adyuvante. Los adyuvantes adecuados para vacunas de la presente invención comprenden los adyuvantes que son capaces de aumentar las respuestas de anticuerpos contra el inmunógeno peptídico de IgE. Los adyuvantes se conocen bien en la técnica (*Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach*, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, volumen 6, eds. Powell, M. F., y Newman, M. J., Plenum Press, Nueva York y Londres, ISBN 0-306-44867-X). Entre los adyuvantes preferidos para usar con inmunógenos de la presente invención se incluyen sales de aluminio o de calcio (hidróxido o fosfato).

Entre los adyuvantes preferidos para usar con inmunógenos de la presente invención se incluyen: sales de aluminio o de calcio (hidróxido o fosfato), emulsiones de aceite en agua (documentos WO 95/17210, EP 0399843) o vehículos particulados tales como liposomas (documento WO 96/33739). Particularmente se prefieren fracciones de saponina inmunológicamente activas (por ejemplo, Quil A) con actividad adyuvante derivada de la corteza del árbol de Sudamérica Quillaja Saponaria Molina. Los derivados de Quil A, por ejemplo QS21 (un derivado de la fracción purificada por HPLC de Quil A) y el procedimiento de su producción se describen en la patente de EE.UU. N° 5.057.540. Entre QS21 (conocido como QA21) también se describen otras fracciones tales como QA17. El lípido A monofosforil 3-des-O-acilado es un adyuvante bien conocido fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Se puede preparar mediante los procedimientos enseñados en el documento GB 2122204B. Una forma preferida del lípido A monofosforil 3-des-O-acilado está en forma de una emulsión con un tamaño de partícula pequeño inferior a 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro (documento EP 0689454 B1).

Entre los adyuvantes también se incluyen, aunque no se limita a ellos, el dipéptido muramil y las saponinas tales como Quil A, lipopolisacáridos bacterianos tales como 3D-MPL (lípido A monofosforil 3-des-O-acilado) o TDM. Como otro ejemplo alternativo, la proteína puede encapsularse en el interior de micropartículas tales como liposomas, o en suspensiones no particuladas o soluciones acuosas de éter de polioxietileno de fórmula general (I)



en la que n es 1-50, A es un enlace o -C(O)-, R es alquilo  $\text{C}_{1-50}$  o fenilalquilo  $\text{C}_{1-50}$  (documento WO 99/52549).

## ES 2 295 768 T3

Ayudantes particularmente preferidos son las combinaciones de 3D-MPL y QS21 (documento EP 0671948 B1), emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (documentos WO 95/17210, PCT/EP98/05714), 3D.MPL formulado con otros vehículos (documento EP 0689454 B1) o QS21 formulado en liposomas que contienen colesterol (documento WO 96/33739) u oligonucleótidos inmunoestimuladores (documento WO 96/02555).

5 Entre los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se incluyen agua, suero salino tamponado con fosfato, soluciones de tampón isotónico.

Asimismo, las preparaciones de ayudantes que comprenden una mezcla de aceite de ricino de polioxietileno o glicéridos de ácido caprílico/caprico, con monoésteres de polioxietileno de sorbitán, y un antígeno, son capaces de inducir respuestas inmunitarias sistémicas tras la administración tópica a una membrana mucosa (documento WO 9417827). Esta solicitud de patente describe la combinación de TWEEN20™ (monoéster de polioxietileno de sorbitán) e Imwitor 742™ (glicéridos de ácido caprílico/caprico). O una combinación de TWEEN20™ y aceite de ricino de polioxietileno para aumentar la respuesta inmunitaria tras la inmunización intranasal. Los novasomas (documento 10 US 5.147.725) son estructuras vesiculares paucilaménares que comprenden éteres de polioxietileno y colesterol con el antígeno encapsulado y son capaces de actuar como ayudantes de la respuesta inmunitaria a antígenos tras la administración sistémica.

También se han formulado tensioactivos de tal modo que formen vesículas de tensioactivo no iónico (habitualmente 20 conocidas como neosomas, documento WO 95/09651).

Otros ayudantes de los que se sabe que potencian las respuestas inmunitarias mucosas y sistémicas incluyen las enterotoxinas bacterianas derivadas de *Vibrio Cholerae* y *Escherichia coli* (en concreto, la toxina del cólera (TC) y la enterotoxina termolábil (LT) respectivamente). La TC y la LT son heterodímeros compuestos por un anillo pentamérico de subunidades  $\beta$ , que rodean una subunidad tóxica A. Su estructura y actividad biológica se describen en Clements y Finklestein, 1979, *Infection and Immunity*, 24: 760-769; Clements y col., 1980, *Infection and Immunity*, 24: 91-97. Recientemente se ha desarrollado un derivado inocuo de la LT que carece del sitio proteolítico requerido para capacitar el "cambio" de la forma inocua de la LT a su forma tóxica, una vez que se ha liberado de la célula. Esta forma de LT (denominada mLT(R192G)) no es susceptible a la escisión proteolítica mediante una sustitución del aminoácido arginina con glicina en la posición 192 y se ha mostrado que posee una toxicidad muy reducida mientras que retiene su potente actividad adyuvante. Por tanto, la mLT(R192G) se denomina mutante del sitio proteolítico. Los procedimientos para fabricar mLT(R192G) se describen en la solicitud de patente WO 96/06627. Entre otras formas mutantes de LT se incluyen los mutantes de sitio activo tales como mLT(A69G), que contienen una sustitución de una glicina con una alanina en la posición 69 de la secuencia de LTA. El uso de mLT(R192G) como vacuna mucosa se describe en la solicitud de patente WO 96/06627. Tales ayudantes pueden combinarse de forma ventajosa con los 35 tensioactivos no iónicos de la presente invención.

Entre otros ayudantes o inmunoestimulantes se incluye el sistema adyuvante oligonucleotídico que contiene un dinucleótido CpG sin metilar (como se describe en el documento WO 96/02555). Un inmunoestimulante particularmente preferido es el oligonucleótido inmunoestimulante CpG, cuyas formulaciones son potentes en la inducción y refuerzo de las respuestas inmunitarias en animales grandes. Los oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias: las secuencias preferiblemente contienen todos los enlaces entre nucleótidos modificados con fosforotioato.

45 OLIGO 1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (ID SEC N° 1)

OLIGO 2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT (ID SEC N° 2)

50 OLIGO 3: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (ID SEC N°3)

Los oligonucleótidos CpG usados en la presente invención pueden sintetizarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, documento EP 468520). Convenientemente, tales oligonucleótidos pueden sintetizarse 55 con un sintetizador automático.

Como alternativa pueden combinarse éteres o ésteres de polioxietileno con vehículos de vacunas compuestos por quitosano y otros polímeros policatiónicos, polilactidas y partículas de polilactida-co-glicolida, partículas compuestas por polisacáridos o polisacáridos químicamente modificados, liposomas sin colesterol y partículas con base de lípidos, emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210), partículas compuestas por monoésteres de glicerol, etc.

Es intención de la presente invención administrar un agente o vacuna en la piel con rapidez y con un elevado rendimiento de administración. Esto puede intensificarse más por una serie de medios, que comprenden el uso de hidratos de carbono altamente solubles como el medio de depósito, y también mediante la agitación y/o el calentamiento del miembro con microaguja durante la administración.

## ES 2 295 768 T3

La cantidad de proteína en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin que produzca efectos secundarios adversos en las vacunas típicas. Tal cantidad variará en función del inmunógeno específico que se usa y cómo se presenta. En general, se espera que cada dosis comprenderá 1-1000  $\mu\text{g}$  de proteína, preferiblemente de 1-500  $\mu\text{g}$ , más preferiblemente de 1-100  $\mu\text{g}$ , de los cuales el intervalo más preferido es de 1 a 50  $\mu\text{g}$ . Una cantidad óptima para una vacuna particular puede determinarse mediante estudios estándar que implican la observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

Las formulaciones mencionadas pueden usarse para propósitos tanto profilácticos como terapéuticos. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un mamífero susceptible a o que padece una enfermedad infecciosa o cáncer, o alergia, o enfermedad autoinmune. En otro aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna como se ha descrito en este documento para usar en medicina. La preparación de vacuna se describe de forma general en *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Soller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, EE.UU., 1978.

Las formulaciones de la presente invención pueden usarse para fines profilácticos y terapéuticos. En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una vacuna como se ha descrito en este documento para usar como medicamento.

La presente invención se ilustra mediante, aunque no se limitan a ellos, los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1

#### *Formulaciones de recubrimiento de azúcar para vacunas*

Se produjo una vacuna contra la hepatitis B y se formuló en 4 azúcares diferentes antes de cubrir una aguja metálica. La vacuna de la hepatitis (HepB) estaba compuesta por partículas de antígeno de superficie recombinante de la hepatitis B (como se describe en Harford y col., 1983, *Develop. Biol. Standard*, 54, 125 y Gregg y col., 1987, *Biotechnology*, 5, 479; EP 0 266 846A y EP 0 299 108A). Resumiendo, las agujas metálicas se sumergieron en una solución de HepB y azúcar y después se liofilizaron. El recubrimiento de las agujas con HepB se confirmó mediante aplicación de las agujas recubiertas secas a un gel.

#### *Materiales*

Solución de lactosa 15,75%

Solución de sacarosa 15,75%

Solución de sacarosa al 80% en agua preparada a partir de sacarosa

Solución de rafinosa 15,75% (pentahidrato de D(+)-rafinosa, Fluka 411308/1 12900)

Solución de trehalosa 15,75%

EPI 2001B60CB096

Masa de HepB purificada

Agujas; aguja N° 8, artículo N° 121 292 de Prim., 52220 Stolberg, Alemania

Gel: Gel pre-cast Novex gel Tris-Glycine 4-20% 1,0 mm X 15 pocillos

#### *Recubrimiento y liofilización de agujas con HepB a 178 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 4 formulaciones de azúcar diferentes*

Se formuló HepB a 178  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en 4 azúcares diferentes al 3,15% (p/v). Las agujas se fijan en un tapón de caucho estándar usado en los viales de liofilización. Las agujas se recubren mediante su introducción (a 2,5 cm de profundidad) una vez en las formulaciones líquidas de HepB. Las agujas y el tapón de caucho se colocan en un vial de liofilización normal y se someten a un ciclo de liofilización estándar. Tras la liofilización, los viales se cerraron empujando por completo el tapón en el vial de forma que las agujas recubiertas se mantienen en un vial cerrado durante su almacenamiento.

## ES 2 295 768 T3

Lactosa	Sacarosa	Rafinosa	Trehalosa	PO <sub>4</sub>	NaCl	HbsAg
3,15%	-	-	-	2 mM	30 mM	178 μg/ml
-	3,15%	-	-	2 mM	30 mM	178 μg/ml
-	-	3,15%	-	2 mM	30 mM	178 μg/ml
-	-	-	3,15%	2 mM	30 mM	178 μg/ml

### 20 *Condiciones de análisis y SDS-PAGE de HepB formulada (antes de la liofilización)*

25 Las muestras de cada formulación se aplican en gel, como control, sin ningún tratamiento reductor. En un gel de tris-glicina 4-20% Novex se cargan 3 μl de cada solución (que representan 0,5 μg de proteína). Tras la electroforesis se aplica tinción de plata. Los resultados se muestran en la figura 8. Los carriles del gel corresponden a: 1. Marcador de PM (Biolabs); 2. Masa de HepB purificada; 3. Marcador de PM (Biolabs); 4 y 5. HepB recubierta en lactosa; 6 y 7. HepB recubierta en sacarosa; 8 y 9. HepB recubierta en rafinosa; 10 y 11. HepB recubierta en trehalosa.

### 30 *Condiciones de análisis y SDS-PAGE de las agujas recubiertas (después de la liofilización)*

35 Las agujas recubiertas secas de cada formulación se aplican directamente en un gel mediante su inserción (a 2 cm de profundidad) durante un breve tiempo en el gel. No se aplica tratamiento reductor alguno. Tras la electroforesis se aplica tinción de plata. Los resultados se muestran en la figura 9, los carriles corresponden a: 1. Marcador de PM (Biolabs); 2. Masa de HepB purificada; 3, 4 y 5. Aguja liofilizada con formulación de lactosa; 6,7 y 8. Aguja liofilizada con formulación de sacarosa; 9, 10 y 11. Aguja liofilizada con formulación de rafinosa; 12, 13 y 14. Aguja liofilizada con formulación de trehalosa.

### 40 *Conclusiones*

No se observó degradación entre la formulación líquida (véase la figura 2) y la formulación liofilizada en la aguja (véase la figura 3). Tanto las muestras líquidas como las liofilizadas dan imágenes similares en el gel. No hay diferencias entre lactosa, sacarosa, rafinosa o trehalosa. Hay proteína en cada aguja.

### 45 *Ejemplo 2*

#### *Prueba cinética de liberación*

50 Tras la inserción de las agujas recubiertas descritas en el Ejemplo 1 en el gel, se comparó la retirada inmediata de la aguja con una aplicación de 1 minuto en el gel de tris-glicina 4-20% Novex. De nuevo, tras la electroforesis se aplicó tinción de plata para marcar la proteína HepB. Los resultados se muestran en la figura 10; los carriles corresponden a: 1. Aguja recubierta con HepB en lactosa insertada y retirada después de 1 minuto; 2. Aguja recubierta con HepB en lactosa insertada y retirada inmediatamente; 3. Vacío; 4. Aguja recubierta con HepB en sacarosa insertada y retirada después de 1 minuto; 5. Aguja recubierta con HepB en sacarosa insertada y retirada inmediatamente; 6. Vacío; 7. Aguja recubierta con HepB en rafinosa insertada y retirada tras 1 minuto; 8. Aguja recubierta con HepB en rafinosa insertada y retirada inmediatamente; 9. Vacío; 10. Aguja recubierta con HepB en trehalosa insertada y retirada tras 1 minuto; 11. Aguja recubierta con HepB en trehalosa insertada y retirada inmediatamente; 12, 13, 14. Vacíos. 15. Marcadores de PM (Biolabs).

60

### *Ejemplo 3*

#### *Liofilización de agujas recubiertas con HepB a 444 μg/ml en % elevado de formulaciones de sacarosa*

65 A partir de soluciones de partida de HepB (888 μg/ml) y solución de sacarosa (a 60% p/v), se preparó una preparación de recubrimiento que tuvo como resultado HepB a 444 μg/ml en sacarosa al 40%, en PBS. Como para el Ejemplo 1, las agujas se fijan en un tapón de caucho estándar usado para liofilización. Las agujas se recubrieron me-

## ES 2 295 768 T3

diante su introducción (a 2,5 cm de profundidad) de una a cinco veces (dejando secarse las agujas entre cada etapa de recubrimiento) en el líquido de la formulación de HepB. Las agujas y el tapón de caucho se colocan en un vial de liofilización normal y se someten a un ciclo de liofilización estándar. Tras la liofilización, los viales se cerraron empujando por completo el tapón en el vial de forma que las agujas recubiertas se mantienen en un vial cerrado durante su almacenamiento.

Inmersión	Sacarosa	PO4	NaCl	HbsAg
Una vez	40%	5 mM	75 mM	444 µg/ml
Cinco veces	40%	5 mM	75 mM	444 µg/ml

### *Condiciones de análisis y SDS-PAGE de las agujas recubiertas (después de la liofilización)*

Las agujas recubiertas secas de cada formulación se aplican directamente en un gel mediante su inserción (a 2 cm de profundidad) en el gel. No se aplica tratamiento reductor alguno. El gel es tris-glicina 4-20% Novex. Tras la electroforesis se aplica tinción de plata. Los resultados de las cinco inmersiones se muestran en la figura 11, los carriles corresponden a: 1. Masa de HepB purificada 1 µg; 2. Masa de HepB purificada 0,5 µg; 3. Masa de HepB purificada 0,3 µg; 4. Masa de HepB purificada 0,2 µg; 5. Masa de HepB purificada 0,1 µg; 6. Masa de HepB purificada 0,05 µg; 7. Masa de HepB purificada 0,01 µg; 8/9/10/11. Vacíos; 12/13/14/15. Aguja liofilizada con formulación de sacarosa al 40% 5 capas.

Los resultados del único procedimiento de inmersión se muestran en la figura 12, en la que los carriles corresponden a: 1. Masa de HepB purificada 1 µg; 2. Masa de HepB purificada 0,5 µg; 3. Masa de HepB purificada 0,3 µg; 4. Masa de HepB purificada 0,2 µg; 5. Masa de HepB purificada 0,1 µg; 6. Masa de HepB purificada 0,05 µg; 7. Masa de HepB purificada 0,01 µg; 8/9/10/11. Vacíos; 12/13/14/15. Aguja liofilizada con formulación de sacarosa al 40% una única capa.

Por tanto, usando HepB a 444 µg/ml y sacarosa en una solución al 40% es posible recubrir más de 1 µg por aguja y probablemente alrededor de 5 µg de depósito tras 5 operaciones de inmersión.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico que tiene al menos un miembro perforador de la piel, revestido con un medio de depósito biodegradable sólido que contiene el agente farmacéutico, en el que el medio de depósito biodegradable sólido forma un vidrio.
2. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según la reivindicación 1 en el que el medio de depósito biodegradable sólido es un poliol.
- 10 3. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según la reivindicación 2 en el que el poliol es un poliol estabilizante.
4. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el medio de depósito biodegradable sólido es un azúcar.
- 15 5. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según la reivindicación 4 en el que el azúcar se selecciona de lactosa, sacarosa, rafinosa o trehalosa.
- 20 6. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que el medio de depósito biodegradable sólido libera el agente farmacéutico en 5 minutos tras la inserción del miembro perforador de la piel y el medio de depósito biodegradable sólido dentro de la piel.
7. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los miembros perforadores de la piel están dimensionados para suministrar el agente en la dermis.
- 25 8. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los miembros perforadores de la piel están dimensionados para suministrar el agente en la epidermis.
9. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los miembros perforadores de la piel son microagujas o microcuchillas.
- 30 10. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según las reivindicaciones 1 a 9, en el que el agente farmacéutico es una vacuna.
- 35 11. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según la reivindicación 10 en el que la vacuna comprende un antígeno.
12. Un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico según la reivindicación 10, en el que la vacuna comprende ácido nucleico que codifica un antígeno.
- 40 13. Un procedimiento para la preparación de un dispositivo de suministro de un agente farmacéutico que comprende preparar una solución del agente farmacéutico y el medio de depósito, seguido por la inmersión de al menos un miembro perforador de la piel en dicha solución, y permitir que la solución se seque encima del miembro perforador de la piel para formar un medio de depósito biodegradable sólido vítreo que contiene el agente farmacéutico.
- 45 14. Un parche cutáneo para el suministro de vacunas que comprende un conjunto de microcuchillas o microagujas recubiertas con un medio de depósito de azúcar vítreo que contiene la vacuna.
- 50
- 55
- 60
- 65

FIG. 1

Miembro del parche con microagujas

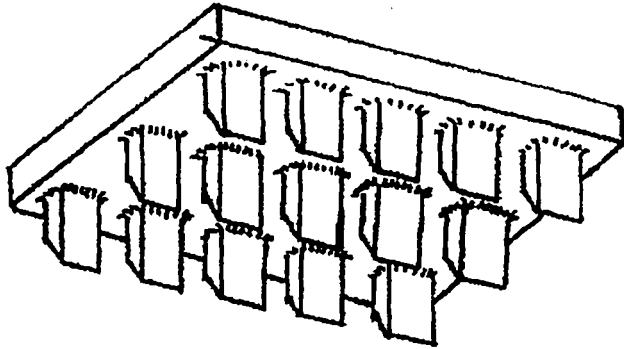


FIG. 2

Diagrama de la sección transversal del miembro del parche con microagujas de la FIG. 1 recubierto con un medio de depósito.

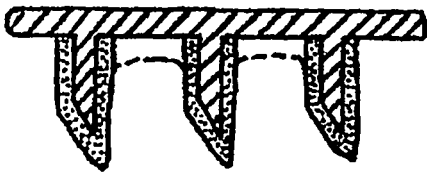


FIG 3,

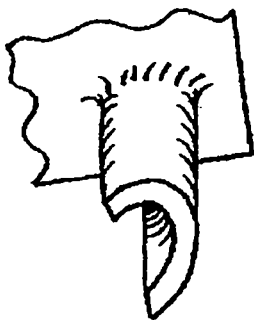


FIG 4

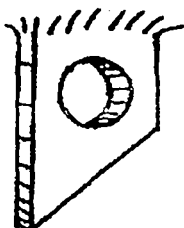


FIG 5, A



B



FIG 6

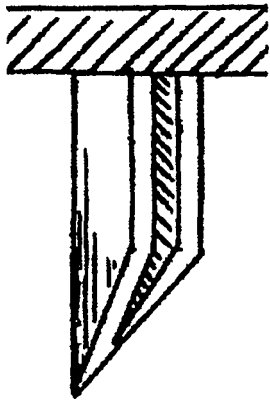


FIG 7,

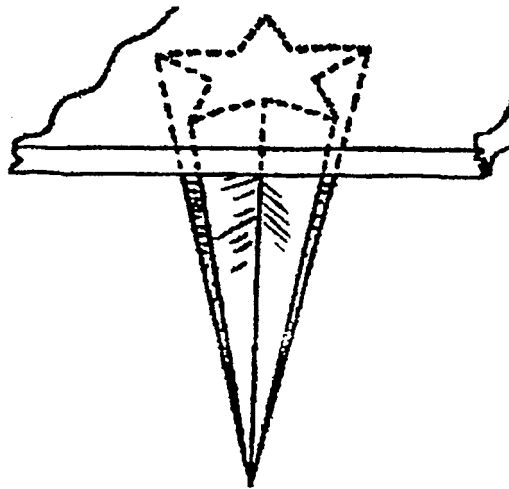


FIG. 8

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

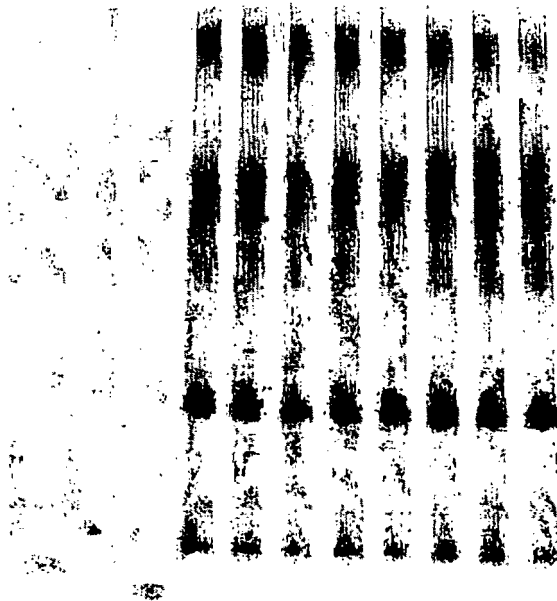


FIG 9.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

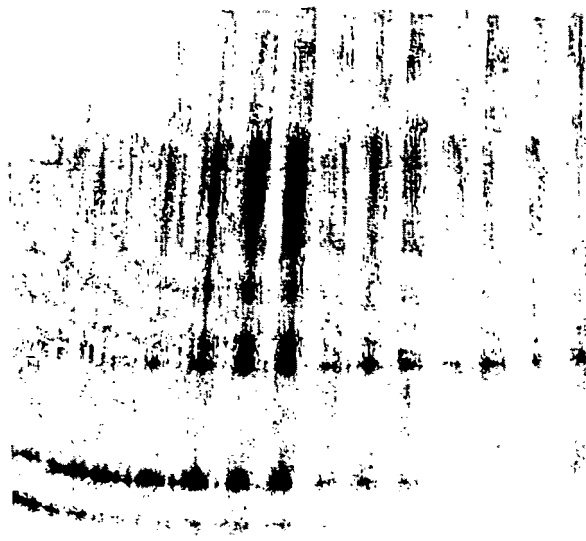


FIG. 10

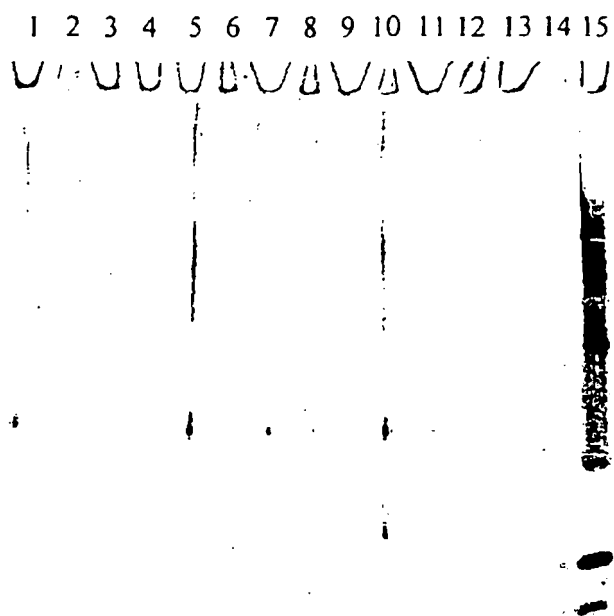


FIG. 11.

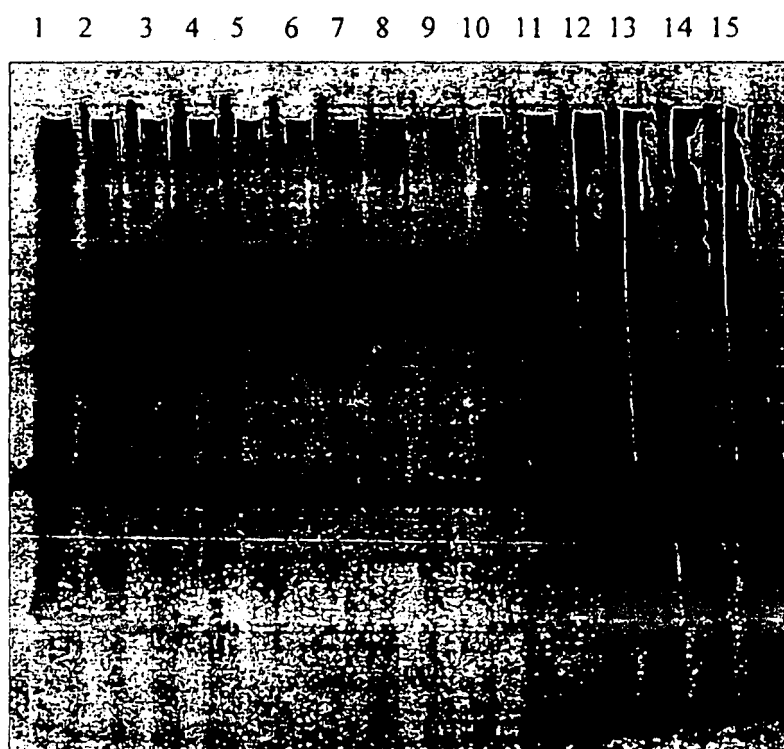


FIG 12.

