

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 987**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00901497 .8**

96 Fecha de presentación: **04.02.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1146906**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2001**

54 Título: **SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN A TRAVÉS DE LAS MUCOSAS.**

30 Prioridad:
05.02.1999 DK 15599
05.02.1999 US 118896 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

73 Titular/es:
ALK-ABELLÓ A/S
BØGE ALLÉ 6-8
2970 HØRSHOLM, DK

72 Inventor/es:
IPSEN, Hans, Henrik y
ULDAL RAHBEK, Janne

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 368 987 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

Sistema de administración a través de las mucosas

5 La presente invención se refiere a composiciones para la administración de sustancias biológicamente interactivas a través de una membrana mucosa, a vacunas así como a un sistema de administración a través de las mucosas que comprende una sal de metal con contenido en oxígeno. En otros aspectos, la invención se refiere a usos para generar respuestas inmunes, vacunaciones y tratamientos de vertebrados, incluidos seres humanos, así como usos en el tratamiento, la prevención o el alivio de reacciones alérgicas. Además de ello, la presente invención concierne al uso de sales de metales con contenido en oxígeno para preparar sistemas de administración a través de las mucosas. Además de ello, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar las composiciones, las vacunas o las formulaciones, así como a los productos obtenibles mediante el procedimiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Enfermedades y diversas afecciones son tratadas de diferentes maneras. A veces, la cirugía es la única opción, pero la mayoría de las afecciones son tratadas, al menos primeramente, administrando un medicamento al paciente para curar o aliviar la enfermedad y/o los síntomas. También se administran medicamentos en calidad de tratamiento profiláctico.

20 A veces, el compuesto activo de un medicamento puede formularse únicamente en forma de inyectables, o el compuesto activo tiene poco o ningún efecto, a menos que se administre por vía parenteral. Esto es particularmente cierto en el caso de muchos antígenos de vacunas.

25 El tratamiento parenteral debe realizarse, con la mayor frecuencia, por parte de un médico. El requisito de designación es experimentado por los pacientes como incómodo. Además de ello, las propias inyecciones son experimentadas habitualmente como desagradables, provocando todo ello poca complacencia por parte del paciente.

30 En la técnica se conocen varios sistemas de administración por vía parenteral. Estos se describen bien en un gran número de libros de texto.

35 Se han realizado varios intentos para preparar formulaciones mucosales que comprenden un compuesto activo que es incapaz de atravesar la membrana mucosa, evitando, de esta forma, la vía parenteral. Sin embargo, los esfuerzos no han tenido mucho éxito, según se evidencia por el número muy restringido de productos de este tipo en el mercado. Esto se debe, entre otros, a la deficiente biodisponibilidad en la biomembrana mucosa.

OBJETO DE LA INVENCION

40 El objeto de la presente invención consiste en proporcionar un sistema de administración para la administración de sustancias biológicamente interactivas a través de una membrana mucosa de un vertebrado. El sistema de administración a través de las mucosas es útil en la formulación de composiciones para la administración de sustancias biológicamente interactivas a través de la membrana mucosa. Se contempla un amplio intervalo de otras aplicaciones que hacen uso del sistema de administración a través de las mucosas y de las composiciones. En particular, el sistema de administración a través de las mucosas puede incorporarse en una vacuna, evitando de esta forma una vacunación parenteral convencional.

45 Así, de acuerdo con la presente invención, es posible una administración de sustancias biológicamente interactivas a través de la membrana mucosa de una manera fácil y eficaz, que debería ser aceptable para todos los pacientes.

50 A partir del documento WO 94/21288 (ref. 1), se conocen composiciones que comprenden una mezcla de un metal coloidal y un factor biológicamente activo e inmunológicamente tóxico. El factor biológico tóxico se selecciona de citoquinas, factores de crecimiento y glucoproteínas procedentes de organismos infecciosos, p. ej. IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, enterotoxina estafilococal B y factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF – siglas en inglés). Las composiciones pueden comprender, además, un adyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, liposomas, dipéptido muramilo o alumbre. El documento describe, además, un método para administrar un factor biológicamente activo y tóxico que proporcione una respuesta inmunológica al factor biológicamente activo, al tiempo que reduzca los efectos tóxicos secundarios que resultan del factor biológicamente activo. La composición se administra preferiblemente por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

60 En el documento WO 95/05194 (ref. 2) se describe el uso de la cápsida del virus de la hepatitis A o un fragmento o epítipo del mismo inmunogénico para las mucosas para la fabricación de una composición de vacuna a través de las

mucosas. La composición de vacuna a través de las mucosas se administra a una superficie de la mucosa de un paciente para inducir la producción de anticuerpos inmunoglobulina G del suero contra la hepatitis A. La composición se formula para la administración a la mucosa nasal o bronquial.

5 A partir del documento JP 65008152 B (ref. 3) se conocen vacunas orales. Las vacunas orales se preparan a partir de bacterias, toxinas bacterianas, virus, rickettsia, etc. mediante (1) inactivación, (2) precipitación mediante adición de astringentes, (3) secando el precipitado y conversión en comprimidos. Así, el objeto consiste en proporcionar un comprimido seco para el cual el fluido gástrico no inactiva el producto. En el resumen no existe mención alguna de un sistema de administración que asegure la administración del compuesto inmunogénico a través de la biomembrana mucosa.

10 A partir del documento GB 2 195 996 (ref. 4) se conoce un complejo de extracto de hojas de té que contiene el compuesto orgánico galato de (-)-epigallocatequina como componente principal e hidróxido de aluminio activo. Se establece que los complejos poseen una actividad anti-ulcerígena, una actividad anti-péptica y antiácida. El complejo formulado en una composición puede ser administrado adecuadamente por vía oral. A pesar de que la composición está prevista para uso por vía oral, el fin de ésta no es la administración de una sustancia a través de la membrana mucosa. El objetivo es el interior del estómago. Así, la administración a través de las mucosas no se describe ni anticipa.

15 A partir del documento GB 1 078 879 (ref. 5) se conoce una composición antiácida que comprende una suspensión ingerible, coloidal y acuosa de hidróxido de aluminio, y al menos una enzima digestiva adsorbida sobre el hidróxido de aluminio. La composición está destinada para uso por vía oral. La composición es para el tratamiento de trastornos del estómago, indigestión, hiperclorhidria, úlcera péptica y afecciones similares. A pesar de que la composición está destinada para uso por vía oral, el fin de esto no es la administración de una sustancia a través de una membrana mucosa. El objetivo es el interior del estómago. Así, no se describe ni anticipa una administración a través de las mucosas.

20 A partir del documento FR 2 143 588 (ref. 6) se conoce una vacuna para la inmunización de aves acuáticas frente a la hepatitis del ganso. La vacuna puede contener hidróxido de aluminio en calidad de un adyuvante. La vacuna se ha de administrar mediante inyección. No se describe ni anticipa la administración a través de una membrana mucosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 La Figura 1 muestra la respuesta de IgG1 el día 35 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®.

La Figura 2 muestra la respuesta de IgG1 el día 35 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico sin soporte de Alhydrogel®.

30 La Figura 3 muestra la respuesta de IgG1 el día 35 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico (grupo testigo).

La Figura 4 muestra la respuesta de IgG2a el día 35 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®.

35 La Figura 5 muestra la respuesta de IgG2a el día 35 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico sin soporte de Alhydrogel®.

La Figura 6 muestra la respuesta de IgG2a el día 35 para ratones inmunizados i. p. con el toxoide tetánico (grupo testigo).

40 La Figura 7 muestra la respuesta de IgG1 el día 56 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®.

45 La Figura 8 muestra la respuesta de IgG1 el día 56 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico sin soporte de Alhydrogel®.

La Figura 9 muestra la respuesta de IgG1 el día 56 para ratones inmunizados i. p. con el toxoide tetánico (grupo testigo).

50 La Figura 10 muestra la respuesta de IgG2a el día 56 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®.

60

La Figura 11 muestra la respuesta de IgG2a el día 56 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico sin soporte de Alhydrogel®.

5 La Figura 12 muestra la respuesta de IgG2a el día 56 para ratones inmunizados i. p. con el toxoide tetánico (grupo testigo).

La Figura 13 muestra la respuesta de IgG1 el día 70 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®.

10 La Figura 14 muestra la respuesta de IgG1 el día 70 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico sin soporte de Alhydrogel®.

15 La Figura 15 muestra la respuesta de IgG1 el día 70 para ratones inmunizados i. p. con el toxoide tetánico (grupo testigo).

La Figura 16 muestra la respuesta de IgG2a el día 70 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®.

20 La Figura 17 muestra la respuesta de IgG2a el día 70 para ratones inmunizados p. o. con el toxoide tetánico sin soporte de Alhydrogel®.

La Figura 18 muestra la respuesta de IgG2a el día 70 para ratones inmunizados i. p. con el toxoide tetánico (grupo testigo).

25 La Figura 19 muestra la respuesta de IgG1 el día 70 para ratones inmunizados p. o. con *Phleum pratense* suspendido con Alhydrogel®.

30 La Figura 20 muestra la respuesta de IgG1 el día 70 para ratones inmunizados p. o. con *Phleum pratense* sin el soporte de Alhydrogel®.

La Figura 21 muestra la respuesta de IgG1 para ratones inmunizados i. p. con *Phleum pratense* (grupo testigo).

35 La Figura 22 muestra la respuesta de IgG2a el día 70 para ratones inmunizados p. o. con *Phleum pratense* suspendido con Alhydrogel®.

La Figura 23 muestra la respuesta de IgG2a el día 70 para ratones inmunizados p. o. con *Phleum pratense* sin el soporte de Alhydrogel®.

40 La Figura 24 muestra la respuesta de IgG2a para ratones inmunizados i. p. con *Phleum pratense* (grupo testigo).

La Figura 25 muestra la respuesta de Ig específica el día 106 para ratones inmunizados s. c. con *Phleum pratense* los días 0, 21, 22, 23.

45 La Figura 26 muestra la respuesta de Ig específica el día 106 para ratones inmunizados s. c. con *Phleum pratense* el día 0 y p. o. los días 21, 22, 23.

La Figura 27 muestra la respuesta de Ig específica el día 106 para ratones inmunizados s. c. con *Phleum pratense* el día 0 y p. o. con placebo los días 21, 22, 23.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se ha mencionado antes, se han realizado varios intentos para preparar formulaciones adecuadas para la administración de sustancias a través de la membrana mucosa. Los intentos no han tenido mucho éxito. O bien las preparaciones no eran efectivas o las eficacias se habían reducido cuando se comparaban con otras vías. Así, el muy limitado número de formulaciones de administración a través de las mucosas comercialmente disponibles en el mercado indica las dificultades con las que se topa cuando se desarrollan composiciones farmacéuticas de este tipo. Se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que la administración a través de la membrana mucosa es, de hecho, posible utilizando un sistema de administración a través de las mucosas según se reivindica en esta memoria.

60 Así, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición para la administración de una sustancia inmunogénica a través de una membrana mucosa de un vertebrado, que comprende (1) al menos una sustancia

5 inmunogénica derivada de alérgenos por inhalación o derivada de alérgenos de venenos, y (2) un sistema de administración a través de las mucosas que comprende una sal de metal con contenido en oxígeno seleccionada de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, acetato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio, Maalox (mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio), hidróxido de berilio, hidróxido de zinc, carbonato de zinc, sulfato de bario y sulfato de zinc.

10 La expresión "sustancia biológicamente interactiva" se refiere a cualquier sustancia que tenga un efecto biológico en sí misma, o a cualquier sustancia que interactúe con o influya sobre otras sustancias, reacciones en el cuerpo y/u órganos, dando como resultado un efecto biológico. También podría ser una sustancia que, cuando está presente en un compartimiento, ejerce un efecto biológico en un compartimiento diferente o sobre el mismo compartimiento biológico.

15 De acuerdo con la invención, la sustancia biológicamente interactiva es una sustancia inmunogénica derivada de alérgenos por inhalación o derivada de alérgenos de venenos.

En la presente invención se puede emplear una amplia gama de sustancias inmunogénicas, así como análogos o derivados de las mismas.

20 Ejemplos de sustancias inmunogénicas son alérgenos y alergoides.

En el presente contexto, el término análogos o derivados pretende incluir formas modificadas de la sustancia biológicamente interactiva. La modificación se puede realizar mediante modificación química o modificación sintética, p. ej. mediante biotilación, desaminación, maleinización, sustitución de uno o más aminoácidos, mediante reticulación, mediante glicosilación o mediante otra tecnología recombinante. El término pretende también incluir mutaciones que se producen de forma natural, isoformas y análogos retroinversos.

La eficacia de las composiciones, formulaciones y vacunas de la invención se refiere al sistema de administración a través de las mucosas, que comprende al menos una sal de metal con contenido en oxígeno.

30 Las sales de metales con contenido en oxígeno se pueden caracterizar por una diversidad de parámetros físico – químicos tales como adsorción, solubilidad y propiedades de disolución, carga iónica medida como el punto isoelectrico pI (pH en el que la carga neta de la sustancia es cero para un compuesto disociable), constante de disociación, coordinación de complejos, configuraciones electrónicas, valencia, orbitales unión y orbitales antienlazantes, propiedades de depósito, propiedades de adhesión, características de superficie, características de las partículas y adyuvancia.

Se piensa que son importantes varias características de las sales de metales para o están relacionadas con los efectos beneficiosos observados del sistema de administración a través de las mucosas descrito en esta memoria.

40 Características comunes para los sistemas de administración son que conservan, retienen, suministran y/o potencian el efecto de la sustancia biológica interactiva en una forma disponible para la administración a través de la membrana mucosa.

45 Se piensa que la sustancia de valor biológico (la sustancia biológicamente interactiva) se adsorbe (o acopla) a la sal de metal con contenido en oxígeno, y esta adsorción contribuye a la eficacia del sistema de administración a través de las mucosas, composiciones, formulaciones y vacunas, respectivamente. Varios factores pueden ser importantes o influyen sobre la adsorción entre la sustancia biológica interactiva y la sal de metal con contenido en oxígeno (véase, p. ej. P.M. Callahan et al., *Pharmaceutical Research* Vol. 8, nº 7, 851-858 (1991) (ref. 7), y *Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach* (ref. 8).

50 Estos factores incluyen el pH, el espacio de tiempo durante el cual se lleva a cabo la reacción de adsorción, las condiciones de mezcladura, concentraciones de los diversos componentes en las formulaciones, composiciones y vacunas, recipientes, temperatura, almacenamiento, tampón y excipientes.

55 Se ha encontrado que, en algunos aspectos de la invención, la adsorción de la sustancia biológica interactiva se ve influenciada por la carga neta/global de la sal de metal y la carga de las sustancias biológicas interactivas, cargas que dependen ambas del pH.

60 El pI de la sal de metal puede variar (de sal a sal) típicamente de 2-11, dando como resultado diferentes intervalos de pH de acoplamiento óptimos. Se pueden emplear tanto condiciones de carácter ácido, alcalinas como neutras, p. ej. para formas comúnmente utilizadas de hidróxido de aluminio, se utiliza un pH de 6-10, se utilizan intervalos de carácter más ácido para acetato de aluminio y más alcalinos para hidróxido de magnesio.

El pI, cuando es relevante, de las sustancias biológicas interactivas disociables puede variar igualmente dentro del intervalo de 2-11, p. ej. para antígenos de proteínas el valor del pI se encuentra a menudo en el intervalo de 4-9.

5 Así, la adsorción se puede llevar a cabo a lo largo de un amplio intervalo de pH, pero preferiblemente las condiciones se eligen en los casos en los que el pH oscila entre el pI de la sal del metal con contenido en oxígeno y el pI medio de las sustancias biológicas interactivas a adsorber. P. ej., se ha obtenido una adsorción eficaz a pH 8,3, en los casos en los que el pI de la sal de metal con contenido en oxígeno, una forma de hidróxido de aluminio, es 9,2, y el pI de la sustancia biológica interactiva, una mezcla de proteínas que contiene *Phleum pratense*, se encuentra dentro del intervalo de 4-9 para las proteínas.

10 Para varias de las sales de metales con contenido en oxígeno (p. ej. $\text{Al}(\text{OH})_3$, Al PO_4), una superficie específica elevada proporciona una capacidad de adsorción elevada para las sustancias biológicamente interactivas.

15 El grado de adsorción variará también con la sal de metal utilizada, y la concentración de trabajo de esto, p. ej. la concentración de trabajo, puede variar para Al^{3+} , preferiblemente entre 0,035-1000 mg/ml formulada como hidróxido de aluminio, lo más preferiblemente entre 0,35-100 mg/ml.

20 La concentración de trabajo de la sustancia biológica interactiva puede influir adicionalmente sobre la adsorción a la sal de metal y puede variar ampliamente en función de la sustancia. Para proteínas, se prefiere un intervalo de concentraciones de trabajo dentro de 0,01 mg/ml-100 mg/ml, lo más preferiblemente dentro de 0,01-10 mg/ml.

25 La interacción entre el sistema de administración y la sustancia biológica interactiva también se ve influenciada por la relación de éstos, durante el proceso de adsorción, así como en la formulación final. La relación (la cantidad de sustancia biológica interactiva/la cantidad de sistema de administración a través de las mucosas sobre una base en peso) debería encontrarse en los intervalos arriba mencionados. Estos pueden variar, por consiguiente, dentro de 0,01-100.000, preferiblemente dentro de 0,01-100, lo más preferiblemente dentro de 1-20.

30 La formulación final debería ser de una composición tal que la cantidad de la sustancia biológica adsorbida a la sal de metal con contenido en oxígeno se encuentra en el intervalo de 5-99%, más preferiblemente de 10-99% de la cantidad añadida.

35 Además, se ha encontrado que la adsorción se ve influenciada por el tipo de sistema tampón elegido (p. ej. NaCl, NaHCO_3 , aminas), la concentración de sal tampón (p. ej. NaCl al 0-40%) y la presencia de excipientes (p. ej. glicerol al 0-70%).

40 La eficacia del acoplamiento depende del período de tiempo durante el cual se lleve a cabo la reacción y la temperatura. Preferiblemente, la adsorción se puede obtener a temperaturas entre 4-45°C, más preferiblemente entre 4-20°C. El período de tiempo preferido para el acoplamiento es de 0,1-48 horas, más preferiblemente de 12-24 horas.

45 Recipientes para el acoplamiento y almacenamiento del producto pueden ser de vidrio y diferentes materiales poliméricos. Es importante elegir un recipiente que no adsorba el producto. P. ej., vidrio de calidad farmacéutica para proteínas.

50 Una característica adicional que se piensa que es importante es la solubilidad de las sales de metales con contenido en oxígeno. Sales de metales con contenido en oxígeno preferidas son insolubles en agua así como sales de metales con contenido en oxígeno que tienen una solubilidad en agua no mayor que 0,01 mol/l a 25°C. Más preferiblemente, sales de metales insolubles con contenido en oxígeno o sales de metales con contenido en oxígeno con una solubilidad en agua no mayor que 0,005 mol/l a 25°C.

55 La sal de metal con contenido en oxígeno puede tener, además, un efecto de depósito. Un efecto de depósito significa que la sustancia biológica interactiva será liberada gradualmente desde la formulación, composición, vacuna o sistema de administración a través de las mucosas. La sustancia activa biológica interactiva quedará, así, retenida con la o las sales de metales con contenido en oxígeno, es decir, con el sistema de administración a través de las mucosas y se liberará gradualmente a partir del mismo. Se piensa que esto tiene un cierto número de efectos beneficiosos, p. ej. una estimulación prolongada, una liberación beneficiosa del fármaco y una protección de las sustancias biológicas interactivas frente a condiciones medioambientales. Se piensa, además, que la sal de metal con contenido en oxígeno del sistema de administración puede poseer determinadas propiedades de atrapamiento, reteniendo así a la sustancia a ser administrada a través de la membrana mucosa.

Otra característica de la invención es la protección de la sustancia biológica interactiva. Ya sea manteniendo el pH

ideal para la sustancia biológica interactiva en el micro-entorno, previniendo así la degradación del ácido, o protegiéndola frente a la degradación enzimática, permitiendo con ello que la sustancia sea administrada a través de la membrana mucosa.

5 Además de ello, algunas de las sales de metales con contenido en oxígeno tienen una capacidad tampón. Esto puede resultar en un microentorno in vivo dentro del sistema de administración, el cual protege a la sustancia biológicamente interactiva del entorno degradable. Esto puede ser, p. ej., una ventaja en el estómago o intestino en donde existe un riesgo de una degradación ácida y enzimática, respectivamente.

10 Una característica adicional de la o las sales de metales con contenido en oxígeno del sistema de administración a través de las mucosas puede ser su capacidad de adherirse a la membrana mucosa, o el efecto que pueden ejercer sobre el movimiento gastrointestinal, p. ej. ralentizándolo. El tiempo de paso prolongado a través del intestino puede ser beneficioso debido a la posibilidad potenciada de prolongar el tiempo durante el cual se permite la interacción de la sustancia biológica interactiva con el tejido diana (membrana mucosa), conduciendo con ello a un transporte incrementado de las sustancias biológicas interactivas a través de la membrana mucosa. También, las propiedades muco-adhesivas de la o las sales de metales con contenido en oxígeno/sistema de administración a través de las mucosas puede permitir ejercer otras funciones, p. ej. propiedades de adyuvantes de las mucosas que pueden dar como resultado un inicio y un efecto más rápidos de la respuesta deseada. Diferentes compuestos con propiedades adyuvantes se describen, p. ej., en la ref. 8, Capítulo 7.

20 Se piensa, además, que el sistema de administración a través de las mucosas de la invención/la o las sales de metales con contenido en oxígeno pueden diseñarse de modo que tengan una preferencia específica para tejidos de la mucosa específicos, p. ej., GALT y parches de Peyer, potenciando además la administración de las sustancias activas a un sitio diana relevante (tejido de la mucosa) tal como en el documento EP 266 119 (ref. 9). Para varias de las sales de metales con contenido en oxígeno (p. ej. $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), el intervalo del tamaño de partículas oscila entre 0,5-15 μm .

25 Se ha observado que puede tener lugar una interacción entre las sustancias biológicas interactivas y los tejidos inmunocompetentes en el tracto gastrointestinal, dando como resultado respuestas sistémicas celulares y, en última instancia, humorales.

30 El sistema de administración a través de las mucosas de la invención es para la administración de una sustancia inmunogénica a través de una membrana mucosa. Membranas mucosas preferidas incluyen la membrana mucosa nasal, la membrana mucosa gastrointestinal y la membrana mucosa sublingual.

35 La sal de metal con contenido en oxígeno a utilizar de acuerdo con la invención puede ser cualquier sal de metal con contenido en oxígeno que proporcione el efecto deseado cuando se formula en el sistema de administración a través de las mucosas. Ejemplos de sustancias con contenido en oxígeno de este tipo son hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, acetato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio, Maalox (mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio), hidróxido de berilio, hidróxido de zinc, carbonato de zinc, sulfato de zinc y sulfato de bario.

40 Las sales de metales con contenido en oxígeno comprenden, además, complejos de coordinación. Una definición de complejos de coordinación se proporciona, p. ej., en The Handbook of Chemistry and Physics 56 Ed., Sección B, Capítulo 7 (1975-76) (ref. 10).

Dentro del presente contexto, la expresión formas mixtas pretende incluir combinaciones de los diversos aniones así como combinaciones con, p. ej., cloruros y sulfuros.

50 Los más preferidos son hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, acetato de aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio y sulfato de zinc.

55 De acuerdo con la invención, las sustancias biológicamente interactivas se seleccionan de sustancias inmunogénicas tales como proteínas naturales, recombinantes o modificadas o fragmentos de las mismas, antígenos, alérgenos (véase más abajo), alergoides tales como complejos de alérgenos modificados con glutaraldehído, péptidos, haptenos conjugados sobre un soporte adecuado tales como hidratos de carbono de KLH (hemocianina de lamprea bocallave), alergoides B tales como complejos de alérgenos modificados con glutaraldehído.

60 La composición de acuerdo con la invención facilita la administración a través de una membrana mucosa en cualquier parte del cuerpo. Así, la composición se puede administrar a través de la vía oral, nasal, vaginal, sublingual, ocular, rectal, urinal, intramamaria, pulmonar, otolar (es decir el oído) o bucal.

La composición puede estar adecuadamente en forma de un spray, un aerosol, una mezcla, comprimidos (entero-revestidos o no entero-revestidos), cápsula (dura o blanda, entero-revestida o no entero-revestida), una suspensión, una dispersión, gránulos, un polvo, una disolución, una emulsión, comprimidos masticables, comprimidos para disolución, gotas, un gel, una pasta, un jarabe, una crema, una pastilla (polvo, granulado, comprimidos), un fluido de instilación, un gas, un vapor, un ungüento, un adhesivo, implantes (oído, ojo, piel, nariz, rectal o vaginal), preparados intramamarios, comprimidos vaginales, supositorios o comprimidos uterinos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una vacuna para la administración de una sustancia inmunogénica a través de una membrana mucosa de un vertebrado, que comprende (1) al menos una sustancia inmunogénica derivada de alérgenos por inhalación o derivada de alérgenos de venenos, y (2) un sistema de administración a través de las mucosas que comprende una sal de metal con contenido en oxígeno, seleccionada de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, acetato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio, Maalox (mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio), hidróxido de berilio, hidróxido de zinc, carbonato de zinc, sulfato de bario y sulfato de zinc.

La vacuna puede ser preferiblemente una en donde la sustancia inmunogénica se selecciona de proteínas naturales, recombinantes o modificadas o fragmentos de las mismas, alérgenos, alergoides, haptenos, péptidos, hidratos de carbono así como análogos o derivados de los mismos. La vacuna puede estar en forma de un spray, un aerosol, una mezcla, comprimidos (entero-revestidos o no entero-revestidos), cápsula (dura o blanda, entero-revestida o no entero-revestida), una suspensión, una dispersión, gránulos, un polvo, una disolución, una emulsión, comprimidos masticables, comprimidos para disolución, gotas, un gel, una pasta, un jarabe, una crema, una pastilla (polvo, granulado, comprimidos), un fluido de instilación, un gas, un vapor, un ungüento, un adhesivo, implantes (oído, ojo, piel, nariz, rectal y vaginal), preparados intramamarios, comprimidos vaginales, supositorios o comprimidos uterinos, adecuados para la administración a través de la vía oral, nasal, vaginal, sublingual, ocular, rectar, urinal, intramamaria, pulmonar, otolar o bucal. La vacuna puede ser adecuada, p. ej., para la vacunación, o la vacunación contra la alergia (desensibilización), prevención o alivio o afecciones alérgicas.

Un sistema de administración a través de las mucosas para la administración de una sustancia biológicamente interactiva a través de una membrana mucosa de un vertebrado forma también parte de la presente invención. Un sistema de administración de este tipo comprende al menos una sal de metal con contenido en oxígeno seleccionada de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, acetato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio, Maalox (mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio), hidróxido de berilio, hidróxido de zinc, carbonato de zinc, sulfato de zinc y sulfato de bario.

El sistema de administración a través de las mucosas puede estar, preferiblemente, en forma de un spray, un aerosol, una mezcla, comprimidos (entero-revestidos o no entero-revestidos), cápsula (dura o blanda, entero-revestida o no entero-revestida), una suspensión, una dispersión, gránulos, un polvo, una disolución, una emulsión, comprimidos masticables, comprimidos para disolución, gotas, un gel, una pasta, un jarabe, una crema, una pastilla (polvo, granulado, comprimidos), un fluido de instilación, un gas, un vapor, un ungüento, un adhesivo, implantes (oído, ojo, piel, nariz, rectal o vaginal), preparados intramamarios, comprimidos vaginales, supositorios o comprimidos uterinos, adecuados para la administración a través de la vía oral, nasal, vaginal, sublingual, ocular, rectar, urinal, intramamaria, pulmonar, otolar o bucal.

La presente invención se refiere también a un uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones para la administración de una sustancia biológicamente interactiva a través de una membrana mucosa de un vertebrado, que comprende administrar una composición según se describe arriba al vertebrado, incluido un mamífero y, en particular, un ser humano.

La presente invención tiene un cierto número de aplicaciones importantes.

Un ejemplo de un sector importante de aplicación es el sector de la vacunación. Uno de los principales logros de los científicos ha sido el desarrollo de vacunas para prevenir enfermedades que amenazan la vida tales como, p. ej., el tétanos o la tuberculosis. La vacunación se realiza tradicionalmente por la vía subcutánea o intramuscular. Mediante la presente invención, es de hecho posible una vacunación a través de una vía de las mucosas. De acuerdo con ello, la presente invención se refiere a un método para generar o alterar una respuesta inmune en un vertebrado, incluido un ser humano, método que comprende administrar al vertebrado una vacuna según se define en esta memoria. Además de ello, la invención se refiere a la vacunación o el tratamiento de un vertebrado, incluido un ser humano, que comprende administrar al vertebrado una vacuna, una formulación o una composición según se define en esta memoria.

En el presente contexto, la expresión respuesta inmune incluye un anticuerpo específico y/o actividad de células B y T, eligiéndose los anticuerpos de las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, así como subclases de las mismas. El término

pretende también incluir otros componentes del suero o los tejidos.

Una respuesta puede considerarse, con relación a la actividad de células T, como mixta o sesgada hacia un tipo Th₁ o Th₂ debido a la adyuvancia (ref. 8, Capítulo 7). Humoralmente, puede resultar en anticuerpos serológicos y/o secretores.

El concepto de vacunación se basa en dos características fundamentales del sistema inmune, a saber la especificidad y la memoria. La vacunación estimulará al sistema inmune del receptor y, tras exposición repetida a las mismas proteínas, el sistema inmune estará en condiciones de responder más rigurosamente al reto de, por ejemplo, una infección microbiana. Las vacunas son mezclas de proteínas destinadas a ser utilizadas en la vacunación con el fin de generar en el receptor una respuesta inmune protectora de este tipo. La protección comprenderá solamente los componentes presentes en la vacuna y antígenos homólogos.

Un sector importante de aplicación de la presente invención es el sector del tratamiento de la alergia, incluido prevenir y aliviar reacciones alérgicas. Es bien conocido que individuos genéticamente predispuestos se vuelven sensibilizados (alérgicos) a antígenos que proceden de una diversidad de fuentes medioambientales a las cuales están expuestos los individuos. La reacción alérgica se produce cuando un individuo previamente sensibilizado se vuelve a exponer al mismo o a un alérgeno homólogo. Respuestas alérgicas oscilan entre la fiebre del heno, rinoconjuntivitis, rinitis y asma hasta anafilaxia sistémica y la muerte en respuesta a, p. ej. las picaduras de abeja o de avispones o las picaduras de insectos. La reacción es inmediata y puede ser provocada por una diversidad de alérgenos atópicos tales como compuestos que proceden de hierbas, árboles, malas hierbas, insectos, ácaros (del polvo doméstico), alimentos, fármacos, productos químicos y perfumes.

Con el fin de eliminar las fuertes reacciones alérgicas, se utilizan habitualmente inyecciones cuidadosamente controladas y repetidas con el alérgeno con el fin de desensibilizar al paciente. Una terapia de este tipo, en la que los pacientes alérgicos son expuestos al alérgeno atacante hasta que se alcanza una dosis de mantenimiento, se continúa habitualmente durante un largo período de tiempo, una vez que se ha alcanzado el nivel de mantenimiento. Esto significa que una vacunación contra la alergia específica incluye más inyecciones en número que un esquema de vacunación tradicional en población sana.

Tradicionalmente, la vacunación se realiza mediante una dosis de estimulación, la cual, después de un determinado período, es seguida por un tratamiento de refuerzo. Para la mayoría de las vacunas, el tratamiento de refuerzo ha de ser repetido cada 5-10 años con el fin de mantener intacta la memoria inmunológica.

En comparación con otros tipos de vacunación, la vacunación de la alergia se complica por la existencia de una respuesta inmune en curso en pacientes alérgicos. Esta respuesta inmune se caracteriza por la presencia de IgE específica para el alérgeno, cuyo efecto primario es la liberación de síntomas alérgicos tras exposición a alérgenos. Así, la vacunación contra la alergia utilizando alérgenos procedentes de fuentes naturales tiene un riesgo inherente de efectos secundarios siendo la consecuencia última la amenaza de la vida al paciente.

De acuerdo con la presente invención, se prevén usos en el tratamiento, prevención o alivio de reacciones alérgicas, que comprenden administrar a un vertebrado, incluido un ser humano, una vacuna según se define en esta memoria.

La sustancia inmunogénica puede derivarse adecuadamente de alérgenos por inhalación que proceden, entre otros, de árboles, hierbas, herbáceas, hongos, ácaros del polvo doméstico, cucarachas y pelo de los animales y caspa. Alérgenos del polen importantes procedentes de árboles, hierbas y herbáceas son aquellos que proceden de los ordenes taxonómicos de *Fagales*, *Oleales* y *Pinales* que incluyen, entre otros, el abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), el orden de *Poales* que incluye, entre otros, hierbas de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis* y *Secale*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales* que incluyen, entre otros, herbáceas de los géneros *Ambrosia* y *Artemisia*. Alérgenos por inhalación importantes procedentes de hongos son, entre otros, aquellos que proceden de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*. Otros alérgenos por inhalación importantes son aquellos procedentes de ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides*, los que proceden de cucarachas y los que proceden de mamíferos tales como gatos, perros y caballos. Además, alérgenos recombinantes de acuerdo con la invención se pueden derivar de alérgenos de venenos, incluidos los que proceden de insectos de picadura o mordisco tales como los del orden taxonómico Hymenoptera, incluidas abejas, avispas y hormigas.

Ha de entenderse que la expresión "derivado de" incluye la sustancia que se produce de forma natural, así como isoformas de la misma. Además de ello, la sustancia se puede preparar por medio de técnicas recombinantes o sintéticas. Componentes específicos de alérgenos son conocidos por las personas expertas en la técnica e incluyen, p. ej., *Bet v 1* (*B. verrucosa*, álamo), *Aln g 1* (*Alnus glutinosa*, aliso), *Cor a 1* (*Corylus avellana*, avellano) y *Car b 1* (*Carpinus betulus*, carpo) del orden *Fagales*. Otros son *Cry j 1* (*Pinales*), *Amb a 1 y 2*, *Art v 1* (*Asterales*), *Par j 1*

(*Urticales*), *Ole e 1* (*Oleales*), *Ave e 1*, *Cyn d 1*, *Dac g 1*, *Fes p 1*, *Hol l 1*, *Lol p 1 y 5*, *Pas n 1*, *Phl p 1 y 5*, *Poa p 1, 2 y 5*, *Sec c 1 y 5* y *Sor h 1* (diversos pólenes de hierbas), *Alt a 1* y *Cla h 1* (hongos), *Der f 1 y 2*, *Der p 1 y 2* (ácaros del polvo doméstico, *D. farinae* y *D. pteronyssinus*, respectivamente), *Bla g 1 y 2*, *Per a 1* (cucarachas, *Blatella germanica* y *Periplaneta americana*, respectivamente), *Fel d 1* (gato), *Can f 1* (perro), *Equ c 1, 2 y 3* (caballo), *Apis m 1 y 2* (abeja mielera), *Ves g 1, 2 y 5*, *Pol a 1, 2 y 5* (todas ellas avispas) y *Sol i 1, 2, 3 y 4* (hormiga del fuego).

Además de ello, la presente invención puede ser útil en aplicaciones de veterinaria. Ejemplos son la vacunación o el tratamiento de la alergia (p. ej. pulgas, ácaros del polvo doméstico). Los animales destinados a recibir las composiciones/formulaciones de la invención incluyen gatos, perros, aves, aves de corral, ganado, ovejas, caballos, otros animales domésticos portadores de pelo, y peces.

Ha de entenderse que las composiciones, formulaciones, vacunas y sistemas de administración a través de las mucosas de la invención pueden comprender, además, adyuvantes, excipientes u otros aditivos o ingredientes adecuados para formulaciones de este tipo. Adyuvantes, excipientes y otros aditivos o ingredientes de este tipo son bien conocidos por la persona experta en la técnica, e incluyen, entre otros, disolventes, emulsionantes, agentes humectantes, plastificantes, sustancias colorantes, cargas, conservantes, agentes ajustadores de la viscosidad, agentes tamponadores, sustancias mucoadhesivas y bioadhesivas. Ejemplos de estrategias de formulación son bien conocidos por la persona experta en la técnica. Ejemplos de sustancias mucoadhesivas y bioadhesivas son lectinas, celulosa o polímeros acrílicos, quitosano y derivados, gomas naturales y poliácridatos.

En particular, los siguientes adyuvantes se pueden utilizar en los diversos productos de la presente invención: interleuquinas (p. ej. IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, INF γ), Adju-Phos[®], glucano, formulación de antígeno, holotoxina del cólera, liposomas, DDE, DHEA, DMPC, DMPG, complejo de DOC/alumbre, adyuvante incompleto de Freund, ISCOMs[®], adyuvante oral LT, dipéptido de muramilo, monofosforil lípido A, tripéptido de muramilo y fosfatidiletanolamina (véase también "Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach", Capítulo 7 (ref. 8)).

También, la administración del sistema de administración, la vacuna o la formulación de la presente invención puede combinarse con otros procesos o vías, es decir, la administración de la sustancia por vía parenteral o por cualquier otra vía de administración. El orden, la secuencia o el intervalo de la administración pueden variar arbitrariamente.

En una realización de la invención, el sistema de administración puede utilizarse para reforzar la respuesta a una vacuna parenteral administrada previamente. Las dosis de refuerzo se pueden administrar preferiblemente (al tejido inmune competente en la nariz, boca, garganta o intestino) a través de la vía oral, bucal, sublingual o nasal.

Se cree que la mejor complacencia del paciente se obtiene con la administración a través de la vía oral. La vía nasal ofrece los volúmenes más pequeños a ser administrados, mientras que la vía bucal/sublingual y la vía rectal tienen propiedades intermedias. Estas vías, es decir, la oral, nasal, bucal, sublingual y gastrointestinal son, por lo tanto, las preferidas.

La cantidad adecuada de la sustancia biológicamente interactiva a administrar depende de la sustancia en cuestión, de la enfermedad o afección a tratar y, además, de la edad, peso y estado del vertebrado en cuestión. Encontrar la dosis óptima será meramente una cuestión de experimentación rutinaria para una persona experta en la técnica.

Es también conocido para una persona experta en la técnica que los fármacos administrados a través de la mucosa deben contener, generalmente, dosis más de 100 veces mayores. La administración por vía oral del alérgeno de abedul para fines de vacunación ha demostrado que la cantidad que ha de ser utilizada con el fin de obtener un efecto terapéutico inmune clínico era 3 órdenes de magnitud a la utilizada en el tratamiento parenteral (Taudorf 1992 (ref. 11)). En consistencia con otros informes, el documento de posición de la EAACI sobre la inmunoterapia local, p. ej. sublingual, ha demostrado también el uso de muy grandes dosis (ref. 12). Este es también el caso para fármacos peptídicos bien conocidos, p. ej. para el péptido la biodisponibilidad de la desmopresina es de 1% después de la administración por vía oral y del 10% después de la administración por vía nasal en comparación con la equivalente parenteral.

Los sistemas de administración según se proporcionan en esta memoria permiten obtener una respuesta eficaz por parte de la administración oral con una cantidad menor de sustancias biológicamente interactivas que la esperada por los experimentos previos.

Puede esperarse que las diferencias en la dosificación para la vía mucosal frente a la parenteral varíen grandemente de sustancia a sustancia y de vía a vía. Las dosis preferidas son 0,1-100, lo más preferiblemente 1-10 veces tan grandes como una dosis bioequivalente parenteral.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición, una

5 vacuna o una formulación según se describe en esta memoria, mezclando un sistema de administración a través de las mucosas según se describe en esta memoria con una sustancia biológicamente interactiva, que incluye, opcionalmente, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Así, la invención se refiere también a una composición, o una vacuna según se describe en esta memoria, que se puede obtener por el procedimiento descrito en esta memoria.

10 Una fase (acuosa) que contiene la sustancia biológicamente interactiva se forma mediante la disolución de la sustancia o mediante dilución de una disolución más concentrada de ésta con agua, que contiene opcionalmente tampones, sales, disolventes o excipientes.

15 Una suspensión (acuosa) o gel de la sal de metal con contenido en oxígeno se forma al añadir agua, que contiene opcionalmente tampón, sales, disolventes o excipientes, a una forma seca de la sal de metal con contenido en oxígeno o, de manera alternativa, opcionalmente al añadir agua que contiene tampón, sales, excipientes, a un gel pre-formado pre-equilibrado. La formulación se realiza, opcionalmente, al combinar una de estas mezclas con una cantidad adecuada de una fase tampón, que contiene opcionalmente sales, disolventes o excipientes, y al añadir la otra mezcla gradualmente a una velocidad controlada bajo agitación o mezclado continua para obtener una formulación concentrada que contiene una fase sólida.

20 La formulación concentrada se deja reposar opcionalmente bajo agitación durante un período de tiempo adecuado.

Esta formulación se puede luego separar por filtración, sedimentar u, opcionalmente, diluir con agua que contiene opcionalmente tampón, sales, disolventes o excipientes, para proporcionar una formulación de dosificación final.

25 Tampones, sales, disolventes o excipientes adecuados son preferiblemente biológicamente aceptables, p. ej. farmacéuticamente aceptables que son, además, inertes o cantidades inertes con respecto a la destrucción de la estructura de la sustancia biológicamente interactiva o la integridad de la estructura de la fase sólida de la sal de metal con contenido en oxígeno, p. ej. el gel o el complejo entre éstos.

30 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Mediante los ejemplos, se prevé, adicionalmente, que la sustancia biológicamente interactiva sea transportada a través de una biomembrana, dado que se observa una respuesta inmune. Respuestas inmunes celulares dependen, por una parte, de la vía de administración a través de la membrana mucosa y, por otra parte, de la disponibilidad de las sustancias a los macrófagos y/u otras células presentadoras de antígenos. Así, se ha demostrado la eficacia de la presente invención.

35 EJEMPLOS

En lo que sigue se proporcionan algunas observaciones generales en relación con los experimentos.

40 **Animales**

Los ratones eran ratones BALB/c A hembras procedentes de Bomholtgard, DK-8920 Ry, Dinamarca, de 6-8 semanas de edad al comienzo del período de dosificación. Estos animales se alojaron en jaulas de policarbonato, a razón de 8 ratones por cada jaula. El lecho era serrín de madera blanda. Todos los animales tenían acceso a la comida y al agua ad libitum. La alimentación era una dieta para roedores completa procedente de Chr. Petersen A/S, DK-4100 Ringsted, Dinamarca.

Grupos testigo de animales

50 **Grupos testigo positivos:** La inmunización por vía intraperitoneal (i. p.) se utilizó como un testigo positivo, dado que se sabe que este método induce fuertes respuestas inmunes después de unas pocas inyecciones.

Sustancias biológicamente interactivas (inmunógenos):

55 **Ejemplos 1 y 5:**

Toxide tetánico (*toxoides T.*) (obtenido de lotes que contenían 2,31 ó 3,0 mg de proteína/ml, Statens Serum Institut, DK-2300 Copenhagen, S, Dinamarca). Cada una de las dosis contenía 30 µg de *toxoides T.* en 0,25 ml.

60 **Ejemplos 2, 3 y 4:**

Extracto de polen de *P. pratense* (Phl p) (obtenido de un lote obtenido según se describe más abajo con un

contenido en proteínas de 85,7% p/p, ALK-Abelló A/S, 2970-Hørsholm, Dinamarca). Cada una de las dosis contenía extracto de Phl p con un contenido predeterminado en proteínas 10^5 0,25 ml, equivalente a 100.000 unidades de calidad estandarizada (SQ)/ml.

5 Preparación de un extracto de *Phleum pratense*: Polen procedente de *Phleum pratense* (Allergon AB, Suecia o Biopol Inc., EE.UU) se extrajo en la relación de 1:10 p/v de NaCl 0,5 M durante 4 horas bajo mezcladura suave a 3-8°C. Después, el polen se separó mediante centrifugación y subsiguiente filtración a través de una malla de 0,22 μ m. Luego, el extracto clarificado se dializó frente a agua destilada durante 72 horas y se liofilizó (véase también la ref. 13).

10

Sales de metales con contenido en oxígeno:

La concentración molar establecida más abajo es para las formulaciones finales.

15 Hidróxido de aluminio, $Al(OH)_3$, Al^{3+} 0,045-0,05 M (1,25 mg de Al^{3+} /ml), o Al^{3+} 0,04-0,045 M (1,13 mg de Al^{3+} /ml) en el Ejemplo 3. Preparado a partir de Alhydrogel[®] al 1,3% (Superfos, DK-2950 Vedbæk, Dinamarca).

20 Fosfato de calcio, $Ca_3(PO_4)_2$, Ca^{2+} 0,034 M. Preparado a partir de adyuvante de fosfato de calcio (Superfos, DK-2950, Vedbæk, Dinamarca).

Fosfato de aluminio, $AlPO_4$, Al^{3+} 0,05 M. Preparado a partir de Adju-phos[®] (Superfos, DK-2950, Vedbæk, Dinamarca).

25 Acetato de aluminio, CaH_7O_5Al , Al^{3+} 0,05 M. Preparado a partir de acetato de aluminio, básico (Sigma, EE.UU.).

Tartrato de calcio, $CaC_4H_9O_6$, Ca^{2+} 0,05 M. Preparado a partir de tartrato de L-(+)-calcio hidrato (Sigma, EE.UU.).

Sulfato de zinc, $ZnSO_4$, Zn^{2+} 0,01 M. Preparado a partir de sulfato de zinc, heptahidrato (Sigma, EE.UU.).

Preparación de las composiciones/formulaciones/vacunas:

Las formulaciones/composiciones/vacunas de ensayo se prepararon como sigue:

35 Los sistemas de administración a través de las mucosas para la administración de una sustancia biológicamente interactiva de acuerdo con la invención que comprende una sal de metal con contenido en oxígeno, se formaron según se describe más abajo.

Ejemplos 1 y 2:

40 El inmunógeno (extracto de alérgeno o toxoide tetánico) se disolvió o diluyó hasta una concentración 10 veces la concentración de la formulación final. Una disolución de inmunógeno 1/10 en vol. se mezcló con tampón Coca 0.0 7/10 en vol. (hidrógeno-carbonato de sodio al 0,25% y cloruro de sodio al 0,5%). Se añadió lentamente Alhydrogel[®] 1,3% 2/10 en vol. En formulaciones para los grupos testigos, que recibían inmunógenos sin Alhydrogel 1,3[®], el Alhydrogel 1,3[®] fue sustituido por tampón Coca 0.0.

45 Estas preparaciones se almacenaron durante no más de 3 semanas. Formulaciones que comprendían sales de metales con contenido en oxígeno y *toxoides T.* se almacenaron a 4°C. Todas las demás formulaciones se almacenaron a -22°C.

Ejemplos 3, 4 y 5:

50 El inmunógeno (extracto de alérgeno o *toxoides T.*) se disolvió o diluyó hasta una concentración 10 veces la concentración de la formulación final. La sal de metal se disolvió o diluyó hasta una concentración cinco veces la concentración de la formulación final con respecto al catión. Disolución de inmunógeno 1/10 en vol. se mezcló lentamente con sal de metal 2/10 en vol. y se dejó agitando durante una noche a 4°C. Al día siguiente, se añadieron lentamente tampón Coca 0.0 7/10 en vol. (hidrógeno-carbonato de sodio al 0,25% y cloruro de sodio al 0,5%).

55 En la formulación para los grupos testigo que recibían la sal de metal sin inmunógeno, el inmunógeno fue sustituido por tampón Coca 0.0.

60 En formulaciones para los grupos testigo que recibían inmunógeno sin sal de metal, la sal de metal fue sustituida por tampón Coca 0.0.

Estas preparaciones se almacenaron durante no más de 3 semanas. Formulaciones que comprendían sales de metales con contenido en oxígeno y *toxoides T.* se almacenaron a 4°C. Todas las demás formulaciones se almacenaron a -22°C.

5

Dosificación:

Ejemplos 1, 2, 3 y 5:

10 Administración por vía peroral (p. o.): Los animales fueron tratados durante dos períodos de en cada caso 14 días, separados por un período de reposo de 4 semanas. Así, de acuerdo con esto, los animales fueron administrados una vez al día los días 0-13, reposaron los días 14-41 y fueron administrados una vez al día los días 42-55. La formulación/vacuna/composición, 0,25 ml/dosis (es decir *toxoides T.* o *P. pratense*) se administraron mediante sonda oral (administración directa al estómago). Los ratones no fueron anestesiados cuando se les dosificaba.

15

Administración por vía intraperitoneal (i. p.): Los animales recibieron tres dosis a intervalos de 14 días (i. p.), 0,25 ml/dosis. Los ratones no fueron anestesiados cuando se les dosificaba.

Ejemplo 4.

20

A los animales se les administraron 0,25 ml por vía subcutánea (s. c.) o 0, 25 ml por s. c. o p. o. de formulación/vacuna/composición de acuerdo con la Tabla 4.

Toma de muestras de sangre:

25

Las muestras de sangre se tomaron de la vena orbital y los sueros se analizaron individualmente mediante ELISA.

ELISA

30 Los Ejemplos 1, 2 y 5 se realizaron en forma de ELISA directo revestido. Los Ejemplos 3 y 4 se realizaron en forma de ELISA sándwich.

Placas:

35 Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 5:

MaxiSorp® F96, NUNC, Dinamarca.

Todos los reactivos descritos más abajo se añadieron en un volumen total de 100 µl/pocillo.

40

Antígeno:

Ejemplos 1 y 5:

45 *Toxoides tetánico (toxoides T.)*, 10 µg de proteína/ml (obtenido de I lote que contenía 2,31 ó 3,0 mg de proteína/ml, Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca).

Ejemplo 2:

50 Extracto de polen procedente de *Phleum pratense (P. pratense)* 3 µg de proteína/ml (obtenido de un lote obtenido según se describe más abajo con un contenido en proteínas de 85,7% p/p, ALK-Abelló, A/S, Hørsholm, Dinamarca).

Ejemplos 3 y 4:

55 1ª capa: 3 µg/ml de a-Ph1 p de conejo (ALK-Abelló A/S, Hørsholm, Dinamarca).
2ª capa: extracto de Ph1 p 30 µg/ml (obtenido del lote con un contenido en proteínas de 85,7% p/p, ALK-Abelló, A/S, Hørsholm, Dinamarca).

Testigos positivos:

Ejemplos 1 y 5:

- 5 La proteína A procedente del anticuerpo monoclonal de IgG2a del tétanos 5.1G11E5E3 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca).

Ejemplos 2, 3 y 4:

- 10 Agrupaciones de suero procedentes de ratones BALB/c A inmunizados i. p. con extracto de polen procedente de *P. pratense* (Bomholtgard, Ry, Dinamarca).

Testigos negativos:

15 Ejemplos 1 y 2:

Agrupaciones de suero procedentes de ratones BALB/c A no inmunizados de 8 meses de edad (Bomholtgard, Ry, Dinamarca).

20 Ejemplos 3, 4 y 5:

Agrupaciones de suero procedentes de ratones BALB/c A no inmunizados de 4 meses de edad (Bomholtgard, Ry, Dinamarca).

25 **Anticuerpo secundario:**

Ejemplos 1 y 2:

- 30 Anti-IgG1 de ratón conjugada a biotina (Pharmingen, Holanda), anti-IgG2a de ratón conjugada a biotina (Pharmingen, Holanda), Ig anti-ratón de conejo conjugada a biotina, P0260 (DAKO, Dinamarca).

Ejemplos 3, 4 y 5:

- 35 Anti-IgG de ratón conjugada a biotina (Jackson ImmunoResearch Laboratories, EE.UU.).

Sustratos:

Ejemplos 1 y 2:

- 40 Estreptavidina conjugada a peroxidasa (DAKO, Dinamarca).

Ejemplos 3, 4 y 5:

- 45 3,3',5',5-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma, EE.UU.).

Inmunoelector:

Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 5:

- 50 Lector EL 340 Bio Kinetics (Bio-Tek Instruments).

Proceso analítico:

Ejemplos 1 y 2:

- 55 Las placas se revistieron durante una noche con el antígeno respectivo. Se añadieron muestras de suero procedentes de animales individuales o animales testigo. Se dejó que la reacción anticuerpo – antígeno tuviera lugar durante una noche. Al día siguiente, se añadieron anticuerpo secundario y sustratos. Las placas se leyeron entonces en un inmunoelector a 470 nm.

60

Ejemplo 5:

Tal como se describe en los Ejemplos 1 y 2, con la excepción de que las placas se bloquearon con albúmina de suero bovino antes de añadir suero. Las placas se leyeron a 450 nm.

5

Ejemplos 3 y 4:

Las placas se revistieron durante una noche con el anticuerpo. Se dejó que la reacción anticuerpo – antígeno en las capas 1ª y 2ª tuviera lugar durante una hora. Se añadieron muestras de suero. Se dejó que esta reacción de antígeno – anticuerpo tuviera lugar durante dos horas, seguido de la adición de anticuerpo secundario y sustratos. Después, las placas se leyeron en un inmunolector a 470 nm.

10

Sueros de análisis para inmunoglobulinas:

15 Ejemplos 1 y 2:

Con el fin de examinar la respuesta inmune generada con respecto al fenotipo Th1/Th2, se determinaron las subclases de IgG. IgG1 se eligió como un marcador para una respuesta de Th2, e IgG2a se eligió como un marcador para una respuesta de Th1.

20

Todas las muestras en los Ejemplos 1 y 2 se analizaron en cuanto a la presencia tanto de IgG1 como de IgG2a. Las curvas de dilución en el ELISA para estos experimentos se muestran en las Figuras 1-24.

La Ig específica se determina por medio de anti-Ig específica.

25

Ejemplos 3, 4 y 5:

Muestras de sangre se analizaron en cuanto a la Ig específica.

30

Los hallazgos se ilustran adicionalmente en las Tablas 3-5 y en las Figuras 25-27.

EJEMPLO 1

Inmunización con el toxoide tetánico

35

La inmunización con toxoide *T.* se realizó p. o. o i. p. (animales testigo) según se describe arriba. Se utilizaron tres grupos de ensayo de 8 animales cada uno. Un grupo recibió dosis orales de la formulación/composición/vacuna de antígeno – hidróxido de aluminio (0,045 – 0,05 M) preparada según se describe arriba. Un grupo recibió dosis orales del antígeno sin el sistema de administración a través de las mucosas con contenido en sal de metal con contenido en oxígeno y un grupo (animales testigo) se inmunizó i. p. con la formulación/composición/vacuna de antígeno – hidróxido de aluminio (0,045-0,05 M) según se describe arriba. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1 que figura a continuación.

40

Los resultados se indican como “número de ratones de respuesta positiva/número total de ratones en el grupo”. “Ig tot.” indica Ig específica.

45

Respuesta positiva

Una respuesta se considera positiva si el valor de DO del suero es mayor que el valor de DO de un suero testigo negativo para al menos dos diluciones consecutivas.

50

Los resultados se representan en las Figuras 1-18.

TABLA 1

	Toxoide T. e hidróxido de aluminio p.o.			Toxoide T. sin hidróxido de aluminio p.o.			Toxoide T. i. p.		
	Ig tot.	IgG1	IgG2a	Ig tot.	IgG1	IgG2a	Ig tot.	IgG1	IgG2a
Toxoide T Día 35		4/8	3/8		4/8	1/8		8/8	8/8
Toxoide T Día 56		5/8	4/8		1/8	1/8		8/8	8/8
Toxoide T Día 70	6/8	7/8	4/8	2/8	2/8	1/8	8/8	8/8	8/8

5 Como se puede observar de la Tabla 1 y las Figuras 1-18, el número de ratones de respuesta positiva (día 70) con niveles de Ig específica observados con inmunización p. o. es equiparable al número de ratones de respuesta positiva observados para la inmunización i. p.

Además de ello, el fenotipo de respuesta (IgG1 e IgG2a) indican ambas respuestas de Th₁ y Th₂.

10 En conclusión, el Ejemplo 1 muestra la capacidad de utilizar la invención para la vacunación por vía oral, estando la sustancia inmunogénica ejemplificada por *toxoides T.*, y estando el sistema de administración a través de las mucosas ejemplificado por hidróxido de aluminio.

15 El hallazgo de que se observa una respuesta inmune indica, además, que es posible utilizar la invención para administrar una sustancia biológicamente interactiva a través de la membrana mucosa.

EJEMPLO 2

Inmunización con *P. pratense*

20 La inmunización se realizó con el alérgeno procedente de *P. pratense* según se describe arriba. Se utilizaron tres grupos de ensayo de 8 animales cada uno. Un grupo recibió dosis orales del antígeno formulado con sistema de administración a través de las mucosas con contenido en hidróxido de aluminio, preparado según se describe arriba. Un grupo recibió dosis orales del antígeno sin el sistema de administración a través de las mucosas con contenido en sal de metal con contenido en oxígeno y un grupo se inmunizó i. p. con la formulación/vacuna de antígeno – hidróxido de aluminio, según se describe arriba. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 que figura a continuación. Los resultados se indican como “número de ratones de respuesta positiva/número total de ratones en el grupo”. “Ig tot.” indica Ig específica.

30 Respuesta positiva

Una respuesta se considera positiva si el valor de DO del suero es mayor que el valor de DO de un suero testigo negativo para al menos dos diluciones consecutivas.

35 Los resultados se visualizan adicionalmente en las Figuras 19-24.

TABLA 2

	Phl. p e hidróxido de aluminio p.o.			Phl. p sin hidróxido de aluminio p.o.			Phl 1 i. p.		
	Ig tot.	IgG1	IgG2a	Ig tot.	IgG1	IgG2a	Ig tot.	IgG1	IgG2a
Phl p Día 70	7/8	4/8	2/8	2/8	2/8	1/8	8/8	8/8	8/8

40 La Tabla 2 muestra el número de ratones (día 70) con niveles de Ig específica en sueros después de inmunización p. o. con Phl p con o sin sistema de administración a través de las mucosas con contenido en hidróxido de aluminio. El número de ratones de respuesta positiva es equiparable al número de ratones de respuesta positiva observados después de la inmunización i. p.

45 Además de ello, el tipo de respuesta (IgG1 e IgG2a) corresponde al observado con la inmunización i. p. Así, se observa que la vacunación de acuerdo con la invención da origen a un estado inmunizado similar al obtenido con la vacunación i. p.

En conclusión, el Ejemplo 2 muestra la capacidad de la presente invención para la vacunación de la alergia, estando

la sustancia inmunogénica ejemplificada por *Phleum.pratense*, y estando la sal de metal con contenido en oxígeno ejemplificada por hidróxido de aluminio.

5 Los resultados mostrados en la Tabla 2 demuestran, además de ello, la absorción a través de la membrana mucosa de un inmunógeno intacto y la subsiguiente presentación a las células relevantes (células B) en una forma que conserva su estructura tridimensional. Se piensa que la administración de una sustancia biológicamente interactiva con una estructura tridimensional esencialmente conservada es necesaria para una respuesta del anticuerpo dependiente de células B. La administración a través del tracto gastrointestinal, utilizando otros sistemas de administración, induce habitualmente la desnaturalización de grandes proteínas y péptidos y, subsiguientemente, destruye la estructura tridimensional y los epítomos de células B, un fenómeno bien conocido para los alérgenos de hierbas (véase, p. ej., la ref. 11).

EJEMPLO 3

15 Inmunización con *Phleum pratense*

La inmunización se llevó a cabo con Phl p en dos formulaciones diferentes que contenían un sistema de administración a través de las mucosas con contenido en hidróxido de aluminio. Se utilizaron cuatro grupos de ensayo de 8 animales cada uno. Un grupo recibió Phl p en una formulación que contenía 1,13 mg de Al/ml de hidróxido de aluminio, preparada según se describe arriba. Un grupo recibió Phl p en una formulación que contenía 1,25 mg de Al/ml de hidróxido de aluminio preparada según se describe arriba. Grupos testigo recibieron la misma cantidad de la formulación de sistema de administración a través de las mucosas con contenido en sal de metal con contenido en oxígeno, 1,13 mg de Al/ml y 1,25 mg de Al/ml sin alérgeno en paralelo. Los resultados se indican como "número de ratones de respuesta positiva/número total de ratones en el grupo".

25 Respuesta positiva:

Una respuesta se considera positiva si el valor de DO del suero es mayor que el valor de DO de un suero testigo negativo para al menos dos diluciones consecutivas.

30

TABLA 3

Formulación de hidróxido de aluminio	Vía de adm.	Respuesta
1,25 mg/ml + Phl. p. Día 70	p.o.	5/8
1,25 mg/ml Día 70	p.o.	1/8
1,13 mg/ml + Phl. p. Día 70	p.o.	6/8
1,13 mg/ml Día 70	p.o.	1/4

35 En conclusión, el Ejemplo 3 demuestra que se pueden emplear diversas formulaciones que contienen diferentes concentraciones de la sal de metal con contenido en oxígeno. La concentración de la sal de metal se puede someter a optimización. En este ejemplo, la sustancia inmunogénica se ejemplifica por *P. pratense*, y la sal de metal con contenido en oxígeno se ejemplifica por hidróxido de aluminio, utilizado en dos concentraciones diferentes.

40 EJEMPLO 4.

Inmunización con *Phleum pratense* utilizando diferentes protocolos de administración

La inmunización se realizó con el alérgeno procedente de *P. pratense*.

45 Tres grupos, de 8 ratones cada uno, se inmunizaron de acuerdo con la Tabla 4 y según se describe bajo el apartado "Dosificación" de arriba.

Respuesta positiva:

50 Sueros procedentes de grupos de ratones se analizaron individualmente, y las curvas de dilución obtenidas se ilustran mediante una lectura de la DO para cada dilución (Figuras 25 – 27). En la parte superior de los puntos medidos, se aplica una línea que ilustra la media geométrica para el grupo. En cada cifra se ilustran dos líneas

obtenidas a partir de los testigos positivos, debido al hecho de que un grupo de ocho ratones fue analizado en dos placas ELISA. Una respuesta se considera positiva si existe una diferencia significativa en la respuesta de DO en la misma dilución procedente de sueros analizados para grupos de ratones a los que se les dosificó diferentemente.

5 Los resultados se visualizan adicionalmente en las Figuras 25-27.

TABLA 4

Grupo	Vía de adm.	Tiempo de dosificación	Formulación de la vacuna
1 s.c. x 4	s.c.	día 0 días 21, 22, 23	Hidróxido de aluminio y Phl p
2 s.c. x 1 + p.o. x 3 activo	s.c. p.o.	día 0 días 21, 22, 23	Hidróxido de aluminio y Phl p
3 s.c. x 1 + x3 placebo	s.c. p.o.	día 0 días 21, 22, 23	Hidróxido de aluminio sin Phl p Placebo

10 A partir de la comparación de las Figuras 25 – 27, se puede observar que el grupo 2 tiene un número significativamente mayor de ratones de respuesta positiva que el grupo 3. El grupo 1 está incluido como un testigo positivo y, por lo tanto, tiene un número significativamente mayor de ratones de respuesta positiva que los grupos 2 y 3.

15 En conclusión, el Ejemplo 4 demuestra que al combinar diferentes vías de administración, puede ser posible inducir una fuerte respuesta inmune con formulaciones activas, pero no con formulaciones placebo. Además de ello, puede ser posible inducir una respuesta que tenga un inicio más temprano, un nivel diagnóstico mayor y/o sea muy consistente.

20 La invención se puede utilizar, p. ej., para administrar inmunizaciones de refuerzo cuando se aplica en combinación con regímenes de vacunación convencionales. Alternativamente, se pueden utilizar ventajosamente diferentes vías de administración para mejorar la vacunación.

25 En este ejemplo, la sustancia biológicamente interactiva se ejemplifica por *P. pratense* y la sal de metal con contenido en oxígeno se ejemplifica por hidróxido de aluminio.

EJEMPLO 5

30 Inmunización con toxoide tetánico utilizando diferentes sales de metales con contenido en oxígeno en el sistema de administración a través de las mucosas

35 La inmunización se realizó utilizando *T. toxoide* formulado con diferentes sales de metales con contenido en oxígeno (véase arriba) en calidad de constituyente del sistema de administración a través de las mucosas. 22 grupos, cada uno de 8 ratones, se inmunizaron de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Se utilizaron 6 sales de metales con contenido en oxígeno diferentes, y las formulaciones se eligieron como cantidad molar del catión equivalente a 1,25 mg/ml de hidróxido de aluminio. Todas las sales de metales con contenido en oxígeno se formularon con *T. toxoide*, según se describe previamente. Los procesos podrían optimizarse probablemente de forma adicional, entre otros, con respecto a los tiempos de reacción, concentraciones relativas y/o pH.

40 Respuesta positiva:

Una respuesta se considera positiva si el valor de DO medido en sueros tomados el día 70 (p. o.) o el día 35 (i. p.) es al menos 0,5 unidades de absorción mayor que la correspondiente señal medida para el grupo testigo negativo.

TABLA 5

sal de metal con contenido en oxígeno	Toxoide T. p.o. en SAM IgG Día 70	Toxoide T. p.o. sin SAM IgG Día 70	SAM p.o. sin toxoide T. IgG Día 70	Toxoide T. i. p. en SAM IgG Día 35
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5/7	1/8	0/8	8/8
AlPO_4	8/8		0/8	8/8
ZnSO_4	3/8	1/8	0/8	8/8
$\text{Al}(\text{OH})_3$	7/8	0/8	0/8	8/8
$\text{CaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$	7/8	0/8	0/8	7/7
$\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{CCO})_2$	6/8		0/8	8/8

SAM significa Sistema de administración a través de las mucosas

5 Como se puede observar de la Tabla 5, todos los grupos inmunizados con el antígeno formulado en una sal de metal con contenido en oxígeno inducen una respuesta inmune en un mayor número de ratones que los grupos testigo inmunizados con antígeno sin sal de metal con contenido en oxígeno o sal de metal con contenido en oxígeno sin antígeno. Todas las composiciones/formulaciones/vacunas inducen una respuesta inmune consistente cuando se utilizan i. p.

10 En conclusión, el Ejemplo 5 demuestra que una amplia gama de sales de metales con contenido en oxígeno puede inducir eficazmente una respuesta inmune cuando se utiliza en un sistema de administración a través de las mucosas de acuerdo con la invención. En este ejemplo, la sustancia inmunogénica se ejemplifica por *toxoides T.* y la sal de metal se ejemplifica por hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, fosfato de aluminio, sulfato de zinc, tartrato de calcio y acetato de aluminio, respectivamente.

15 REFERENCIAS

1. Documento WO 94/21288 (Assay Research, Inc.).
2. Documento WO 95/05194 (Medeva Holdings B. V.)
- 20 3. Documento JP 65008152 B (Resumen) (Yaoi, H.)
4. Documento GB 2 195 996 (Mitsui Norin Company Limited)
- 25 5. Documento GB 1 078 879 (Parke, Davis & Company)
6. Documento FR 2 143 588 (Herman Schettler)
7. P.M. Callahan et al., *Pharmaceutical Research* Vol. 8, Nº. 7, 851-858 (1991)
- 30 8. "Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach", Capítulos 7, 8 y 9, Ed. M. F. Powell & M. J. Newman (1995), Plenum Press
9. Documento EP 266 119 (Southern Research Institute y The UAB Research Foundation)
- 35 10. *The Handbook of Chemistry and Physics* 56 Ed., Sección B, Capítulo 7 (1975 – 1976)
11. E. Taudorf: "Oral Immunotherapy", Tesis Doctoral, 1992, Editorial Lægeföreningens, Copenhagen, Dinamarca
- 40 12. Documento de posición de la EAACI: "Local immunotherapy", 1998, Subcomité de Inmunoterapia de la EAACI y el Comité de Inmunoterapia de la ESPACI
13. Ipsen & Løwenstein, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 72, Nº. 2, 150-159 (1983)

REIVINDICACIONES

- 1.- Composición para la administración de una sustancia inmunogénica a través de una membrana mucosa de un vertebrado, que comprende
- 5 (1) al menos una sustancia inmunogénica derivada de alérgenos por inhalación o derivada de alérgenos de venenos, y
 (2) un sistema de administración a través de las mucosas que comprende al menos una sal de metal con contenido en oxígeno, seleccionada de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, acetato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio, Maalox (mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio), hidróxido de berilio, hidróxido de zinc, carbonato de zinc, sulfato de bario y sulfato de zinc.
- 10 2.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal de metal con contenido en oxígeno es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, acetato de aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio o sulfato de zinc.
- 15 3.- Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde la sustancia inmunogénica se deriva de alérgenos por inhalación.
- 4.- Composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el alérgeno por inhalación procede de árboles, hierbas, herbáceas, hongos, ácaros del polvo doméstico, cucarachas y pelo de los animales y caspa.
- 20 5.- Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, que comprende, además, un bioadhesivo.
- 6.- Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende, además, un adyuvante farmacéuticamente aceptable tal como interleuquinas (p. ej. IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12 e INF γ), glucano, formulación de antígeno, holotoxina del cólera, liposomas, DDE, DHEA, DMPC, DMPG, complejo de DOC/alumbre, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante oral LT, dipéptido de muramilo, monofosforil lípido A, tripéptido de muramilo y fosfatidiletanolamina.
- 25 7.- Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en forma de un spray, un aerosol, una mezcla, comprimidos (entero-revestidos o no entero-revestidos), cápsula (dura o blanda, entero-revestida o no entero-revestida), una suspensión, una dispersión, gránulos, un polvo, una disolución, una emulsión, comprimidos masticables, comprimidos para disolución, gotas, un gel, una pasta, un jarabe, una crema, una pastilla (polvo, granulado, comprimidos), un fluido de instilación, un gas, un vapor, un ungüento, un adhesivo, implantes (oído, ojo, piel, nariz, rectal y vaginal), preparados intramamarios, comprimidos vaginales, supositorios o comprimidos uterinos.
- 30 8.- Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para la administración oral, nasal, vaginal, sublingual, ocular, rectar, urinal, intramamaria, pulmonar, otolar (a través del oído) o bucal.
- 9.- Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la membrana mucosa es una membrana mucosa nasal, membrana mucosa bucal, una membrana mucosa sublingual o una membrana mucosa gastrointestinal.
- 40 10.- Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para uso en el tratamiento, prevención o el alivio de reacciones alérgicas.
- 45 11.- Vacuna para la administración de una sustancia inmunogénica a través de una membrana mucosa de un vertebrado, que comprende
 (1) al menos una sustancia inmunogénica derivada de alérgenos por inhalación o derivada de alérgenos de venenos, y
 (2) un sistema de administración a través de las mucosas que comprende al menos una sal de metal con contenido en oxígeno, seleccionada de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, acetato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio, Maalox (mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio), hidróxido de berilio, hidróxido de zinc, carbonato de zinc, sulfato de bario y sulfato de zinc.
- 50 12.- Vacuna de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la sal de metal con contenido en oxígeno es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, acetato de aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio o sulfato de zinc.
- 55 13.- Vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 11-12, en donde la sustancia inmunogénica se deriva de alérgenos por inhalación.
- 60 14.- Vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el alérgeno por inhalación procede de árboles, hierbas,

herbáceas, hongos, ácaros del polvo doméstico, cucarachas y pelo de los animales y caspa.

15.- Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, que comprende, además, un bioadhesivo.

5 16.- Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, que comprende, además, un adyuvante farmacéuticamente aceptable tal como interleuquinas (p. ej. IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12 e INF γ), glucano, formulación de antígeno, holotoxina del cólera, liposomas, DDE, DHEA, DMPC, DMPG, complejo de DOC/alumbre, adyuvante completo de Freund, adyuvante oral LT, dipéptido de muramilo, monofosforil lípido A, tripéptido de muramilo y fosfatidiletanolamina.

10 17.- Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en forma de un spray, un aerosol, una mezcla, comprimidos (entero-revestidos o no entero-revestidos), cápsula (dura o blanda, entero-revestida o no entero-revestida), una suspensión, una dispersión, gránulos, un polvo, una disolución, una emulsión, comprimidos masticables, comprimidos para disolución, gotas, un gel, una pasta, un jarabe, una crema, una pastilla (polvo, granulado, comprimidos), un fluido de instilación, un gas, un vapor, un ungüento, un adhesivo, implantes (oído, ojo, piel, nariz, rectal y vaginal), preparados intramamarios, comprimidos vaginales, supositorios o comprimidos uterinos.

15 18.- Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-17, para la administración oral, nasal, vaginal, sublingual, ocular, rectar, urinal, intramamaria, pulmonar, otolar o bucal.

20 19.- Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-18, en donde la membrana mucosa es una membrana mucosa nasal, membrana mucosa bucal, una membrana mucosa sublingual o una membrana mucosa gastrointestinal.

25 20.- Vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-19, para uso en el tratamiento, prevención o el alivio de reacciones alérgicas.

30 21.- Uso de un sistema de administración a través de las mucosas para la preparación de un medicamento que comprende una sustancia inmunogénica derivada de alérgenos por inhalación o derivada de alérgenos de venenos para la administración a través de una membrana mucosa de un vertebrado, en donde dicho sistema de administración comprende al menos una sal de metal con contenido en oxígeno, seleccionada de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, acetato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio, Maalox (mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio), hidróxido de berilio, hidróxido de zinc, carbonato de zinc, sulfato de bario y sulfato de zinc.

35 22.- Uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la sal de metal con contenido en oxígeno es hidróxido de aluminio, acetato de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, tartrato de calcio o sulfato de zinc.

40 23.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 21-22, en donde la sustancia inmunogénica se deriva de alérgenos por inhalación.

24.- Uso de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el alérgeno por inhalación procede de árboles, hierbas, herbáceas, hongos, ácaros del polvo doméstico, cucarachas y pelo de los animales y caspa.

45 25.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 21-24, que comprende, además, un bioadhesivo.

50 26.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 21-25, en donde dicho sistema de administración comprende, además, un adyuvante farmacéuticamente aceptable tal como interleuquinas (p. ej. IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12 e INF γ), glucano, formulación de antígeno, holotoxina del cólera, liposomas, DDE, DHEA, DMPC, DMPG, complejo de DOC/alumbre, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante oral LT, dipéptido de muramilo, monofosforil lípido A, tripéptido de muramilo y fosfatidiletanolamina.

55 27.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 21-26, en donde dicho sistema de administración está en forma de un spray, un aerosol, una mezcla, comprimidos (entero-revestidos o no entero-revestidos), cápsula (dura y blanda, entero-revestida o no entero-revestida), una suspensión, una dispersión, gránulos, un polvo, una disolución, una emulsión, comprimidos masticables, comprimidos para disolución, gotas, un gel, una pasta, un jarabe, una crema, una pastilla (polvo, granulado, comprimidos), un fluido de instilación, un gas, un vapor, un ungüento, un adhesivo, implantes (oído, ojo, piel, nariz, rectal o vaginal), preparados intramamarios, comprimidos vaginales, supositorios o comprimidos uterinos.

60 28.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 21-27, en donde dicho sistema de administración se formula para la administración oral, nasal, vaginal, sublingual, ocular, rectar, urinal, intramamaria, pulmonar, otolar o bucal.

- 29.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 21-28, en donde la membrana mucosa es una membrana mucosa nasal, membrana mucosa bucal, una membrana mucosa sublingual o una membrana mucosa gastrointestinal.
- 5 30.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 21-29, para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o el alivio de reacciones alérgicas.
- 31.- Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-10 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o alivio de reacciones alérgicas.
- 10 32.- Uso de una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 11-20 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o alivio de reacciones alérgicas.
- 15 33.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 31-32 para la fabricación de un medicamento en una forma de administración a través de una membrana bucal, sublingual, nasal o intestinal.
- 34.- Uso de acuerdo con la reivindicación 31, en donde para la fabricación de la vacuna se utiliza una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-10.
- 20 35.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 31-34 para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o la prevención mediante vacunación específica contra alergia.

Respuesta de IgG1 el día 35 para ratones inmunizados p.o. con toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®

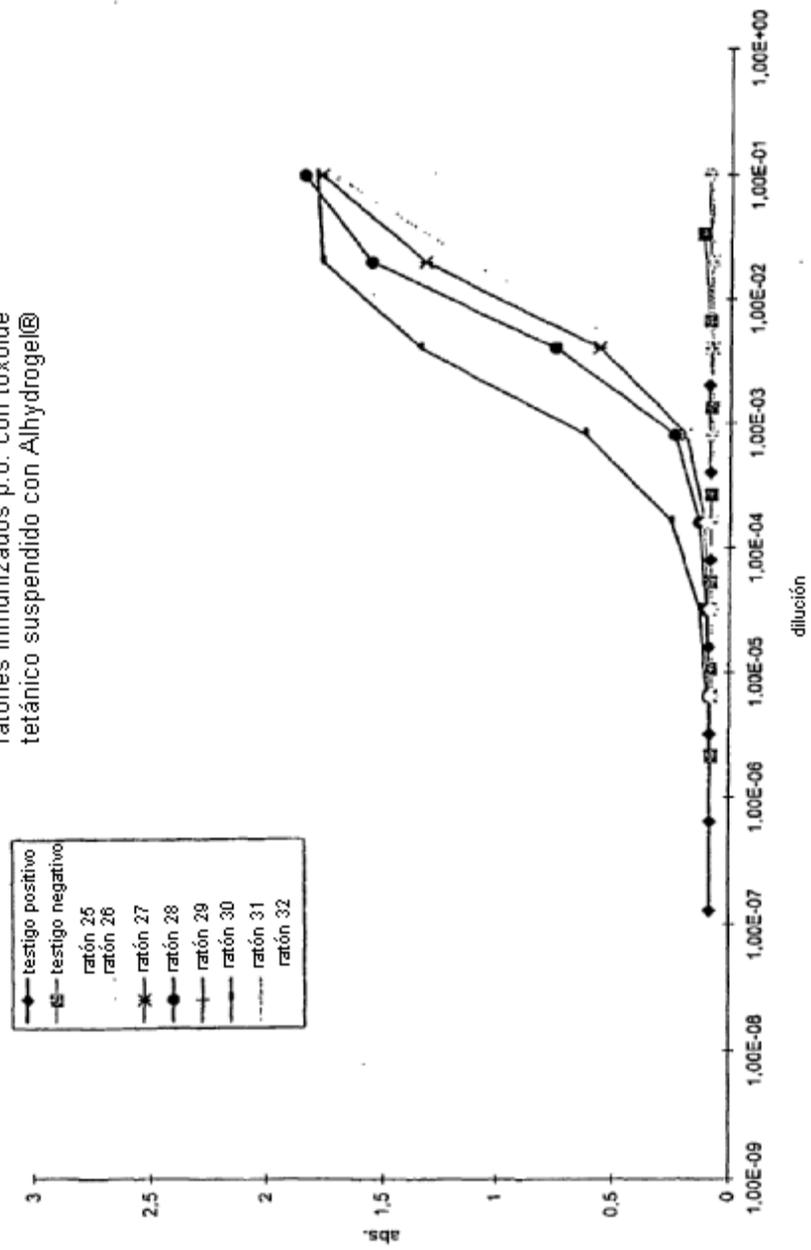


Figura 1

Respuesta de IgG1 el día 35 para ratones inmunizados p.o. con toxoide tetánico suspendido sin Alhydrogel®

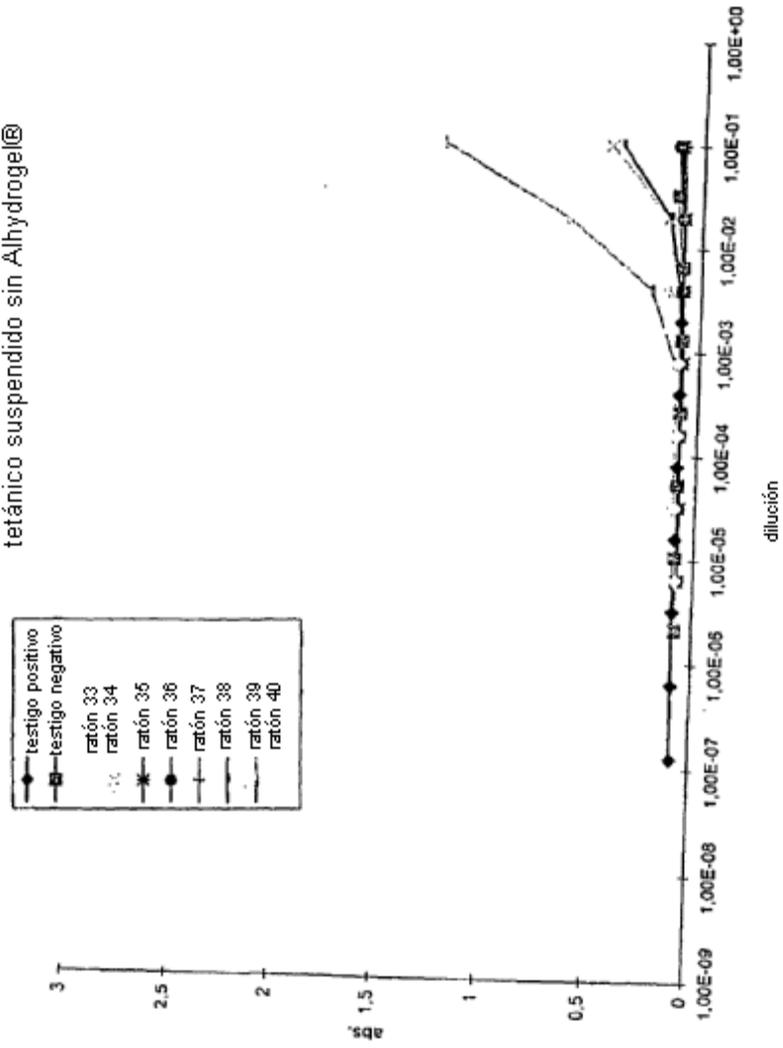


Figura 2

Respuesta de IgG1 el día 35 para
 ratones inmunizados i.p. con toxoide
 tetánico (grupo testigo)

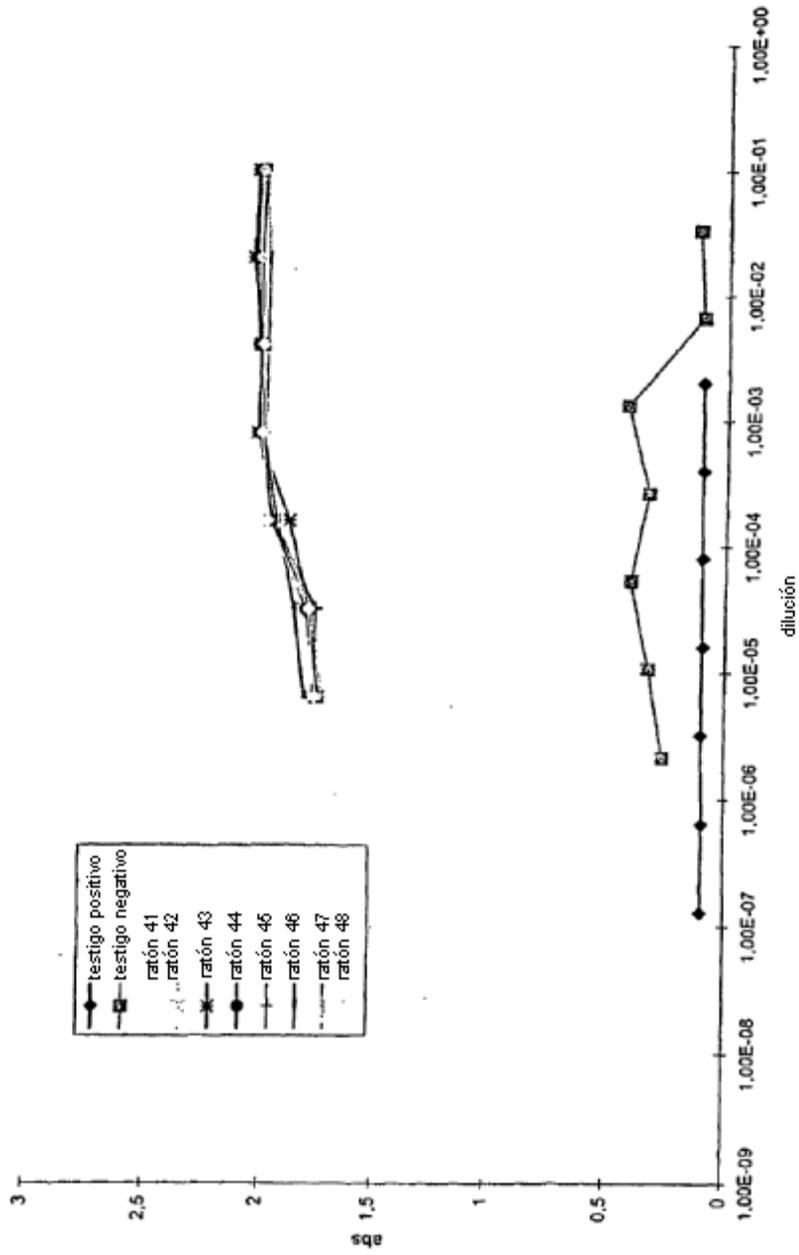


Figura 3

Respuesta de IgG2 el día 35 para ratones inmunizados p.o. con toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®

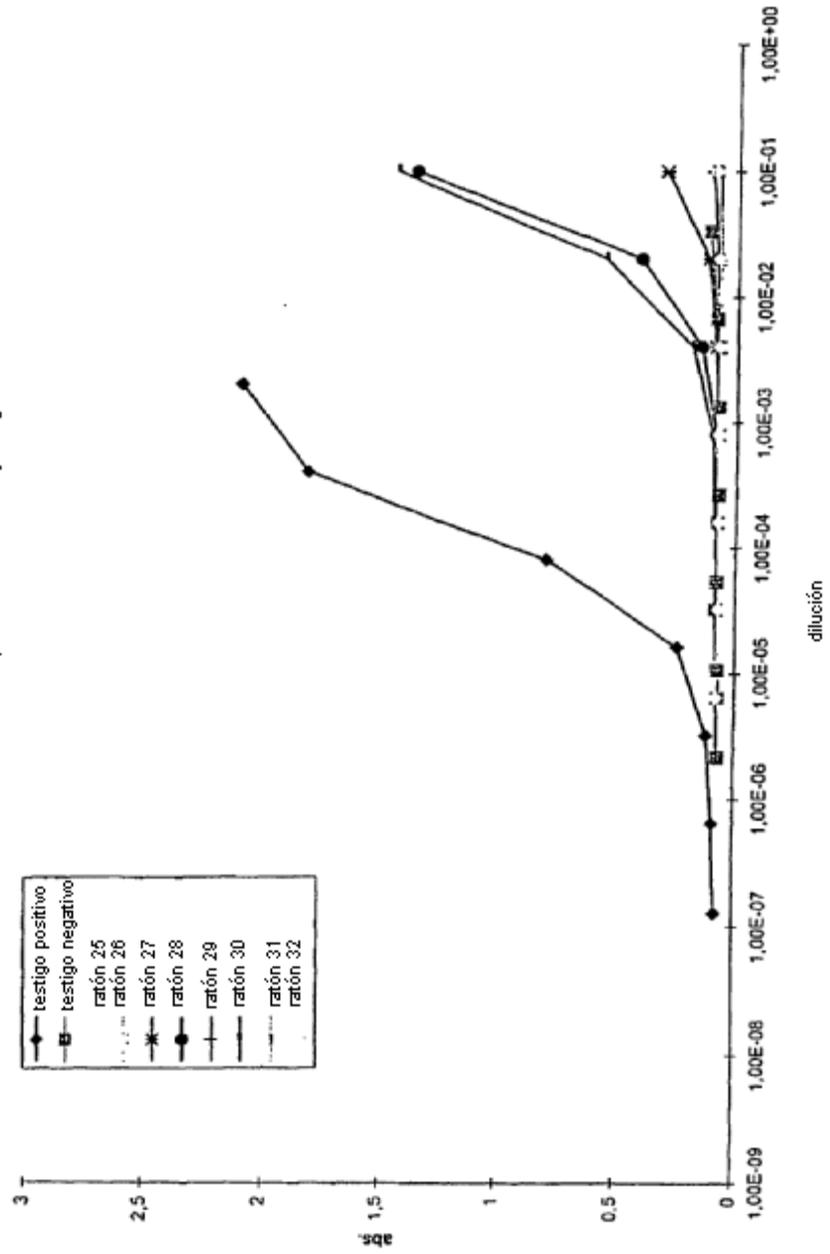


Figura 4

Respuesta de IgG2 el día 35 para
 ratones inmunizados p.o. con toxoide
 tetánico suspendido sin Alhydrogel®

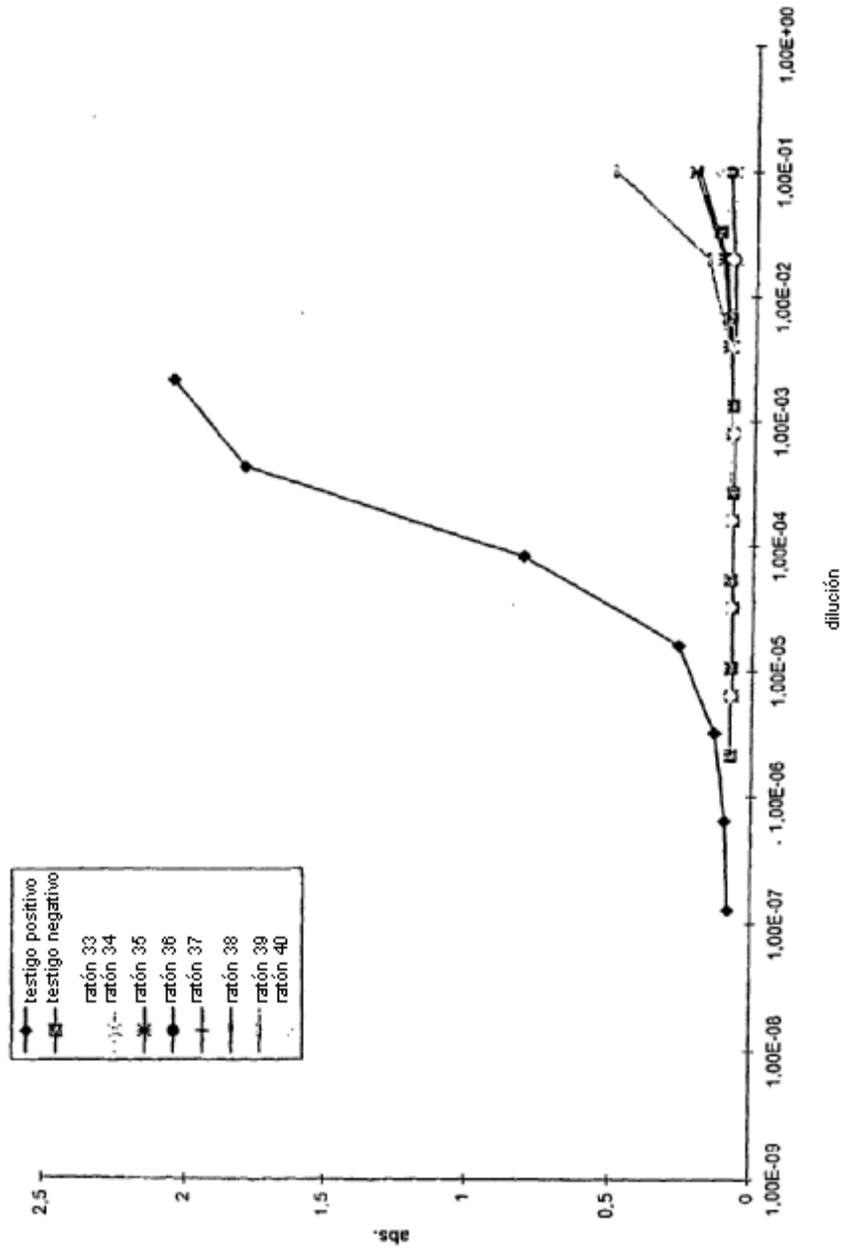


Figura 5

Respuesta de IgG2 el día 35 para ratones inmunizados i.p. con toxoide tetánico (grupo testigo)

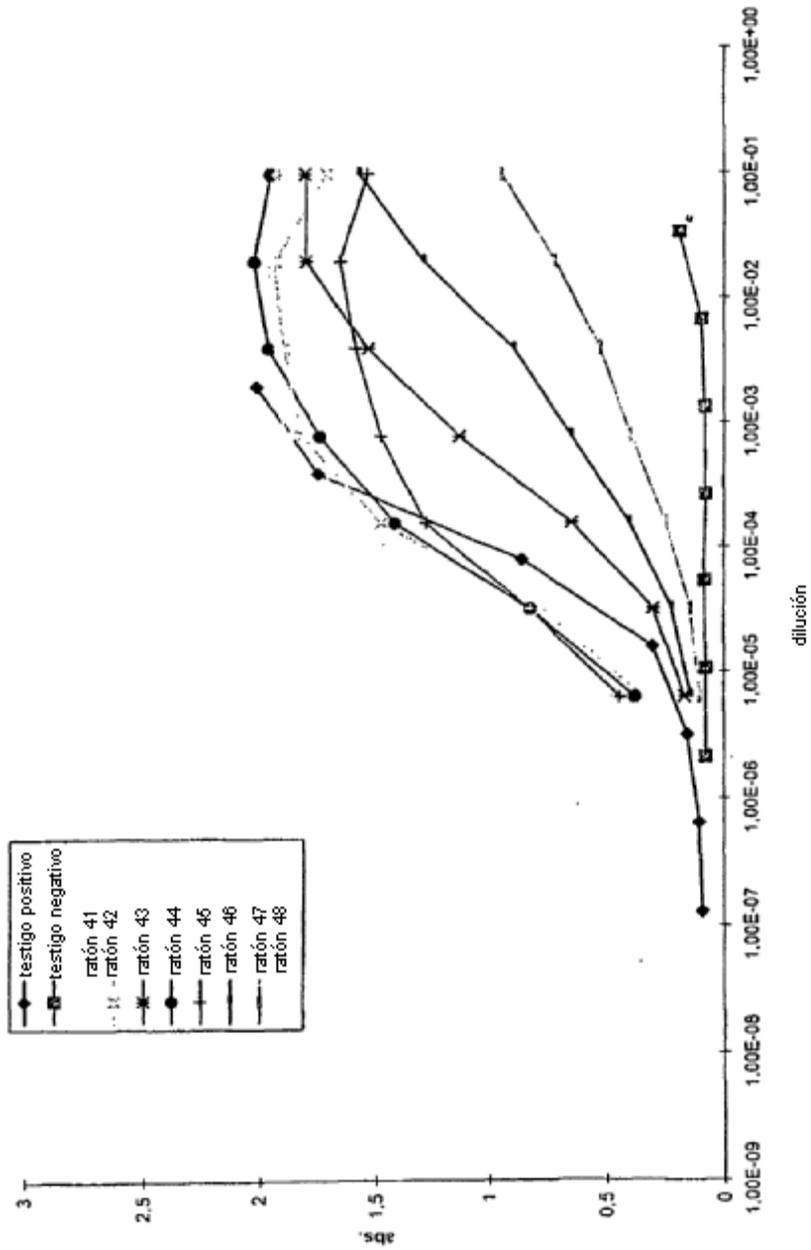


Figura 6

Respuesta de IgG1 el día 56 para ratones inmunizados p.o. con toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®

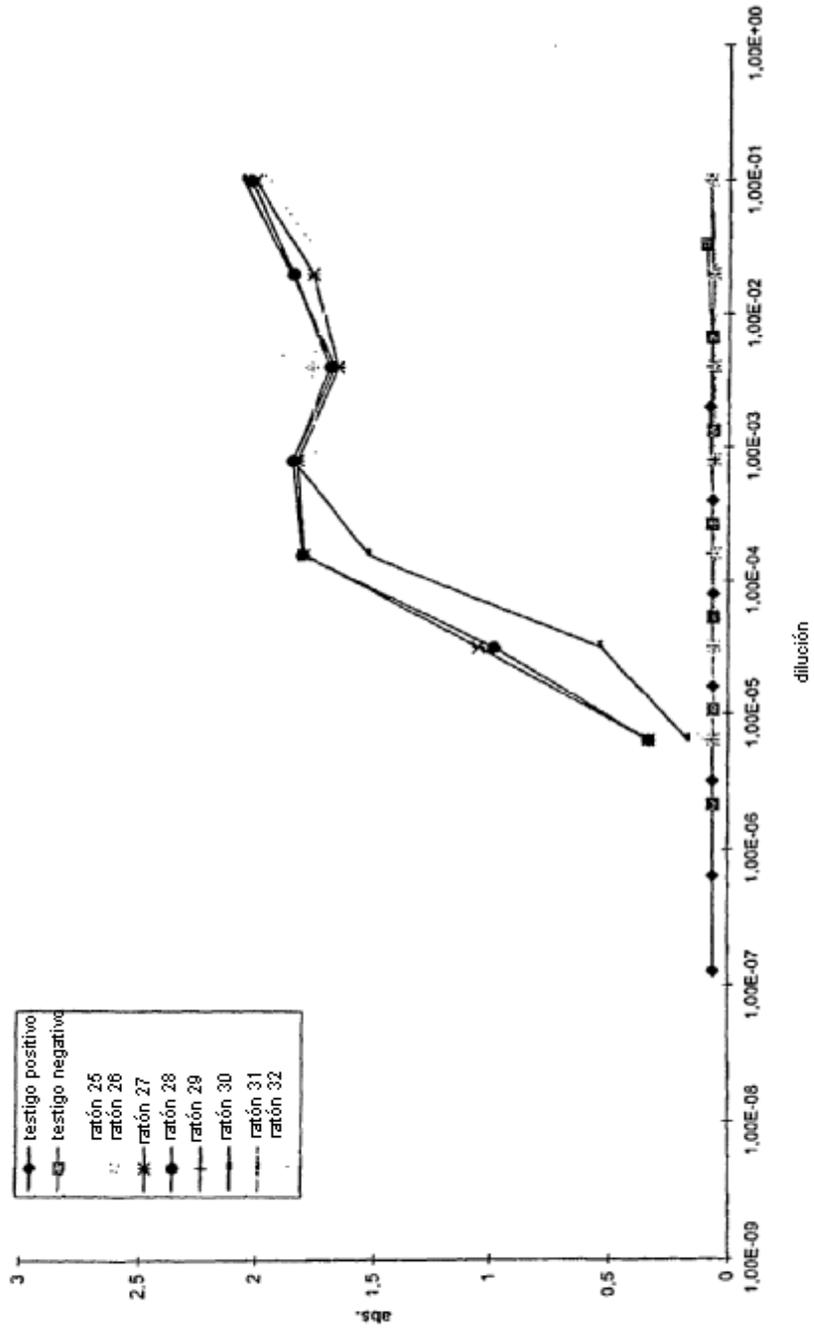


Figura 7

Respuesta de IgG1 el día 56 para
 ratones inmunizados p.o. con toxoide
 tetánico sin Alhydrogel®

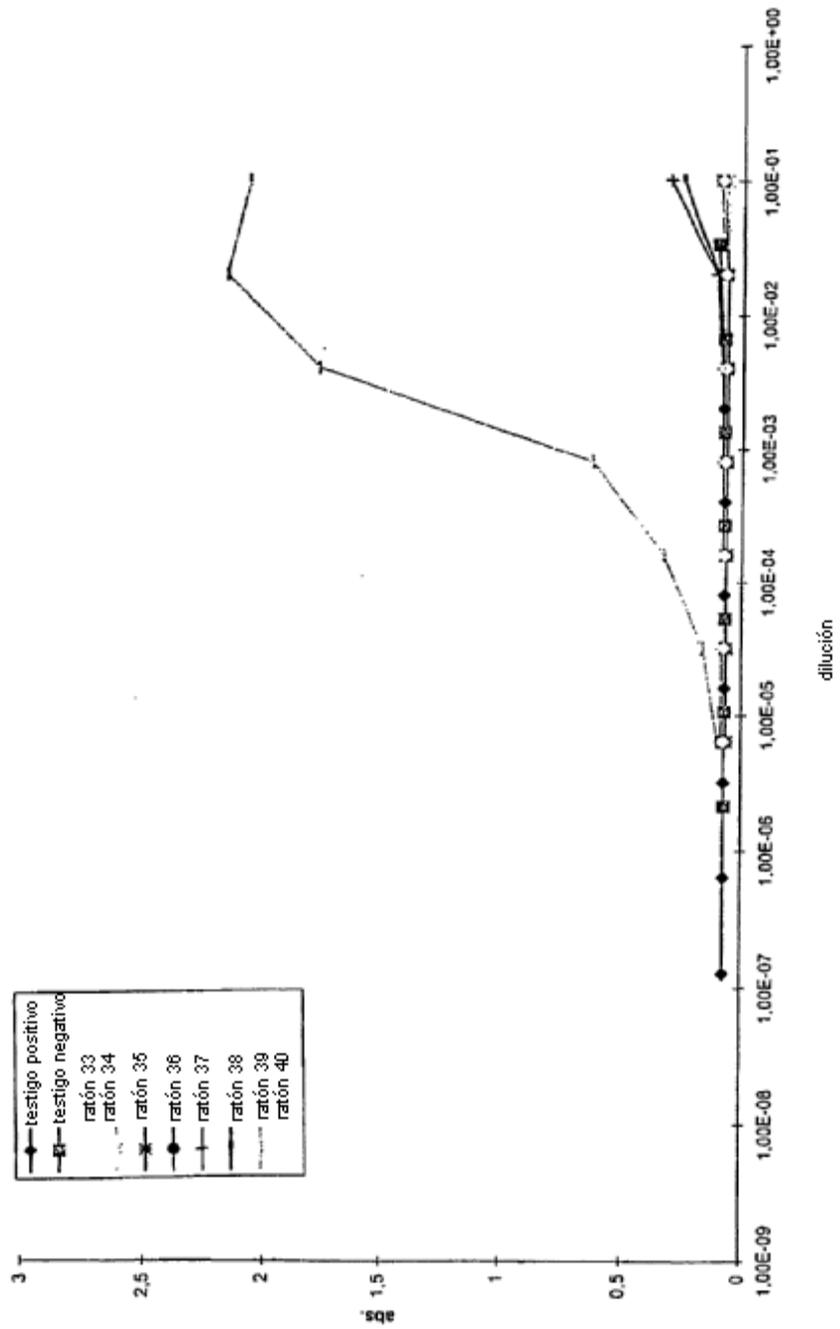


Figura 8

Respuesta de IgG1 el día 56 para ratones inmunizados i.p. con toxoide tetánico (grupo testigo)

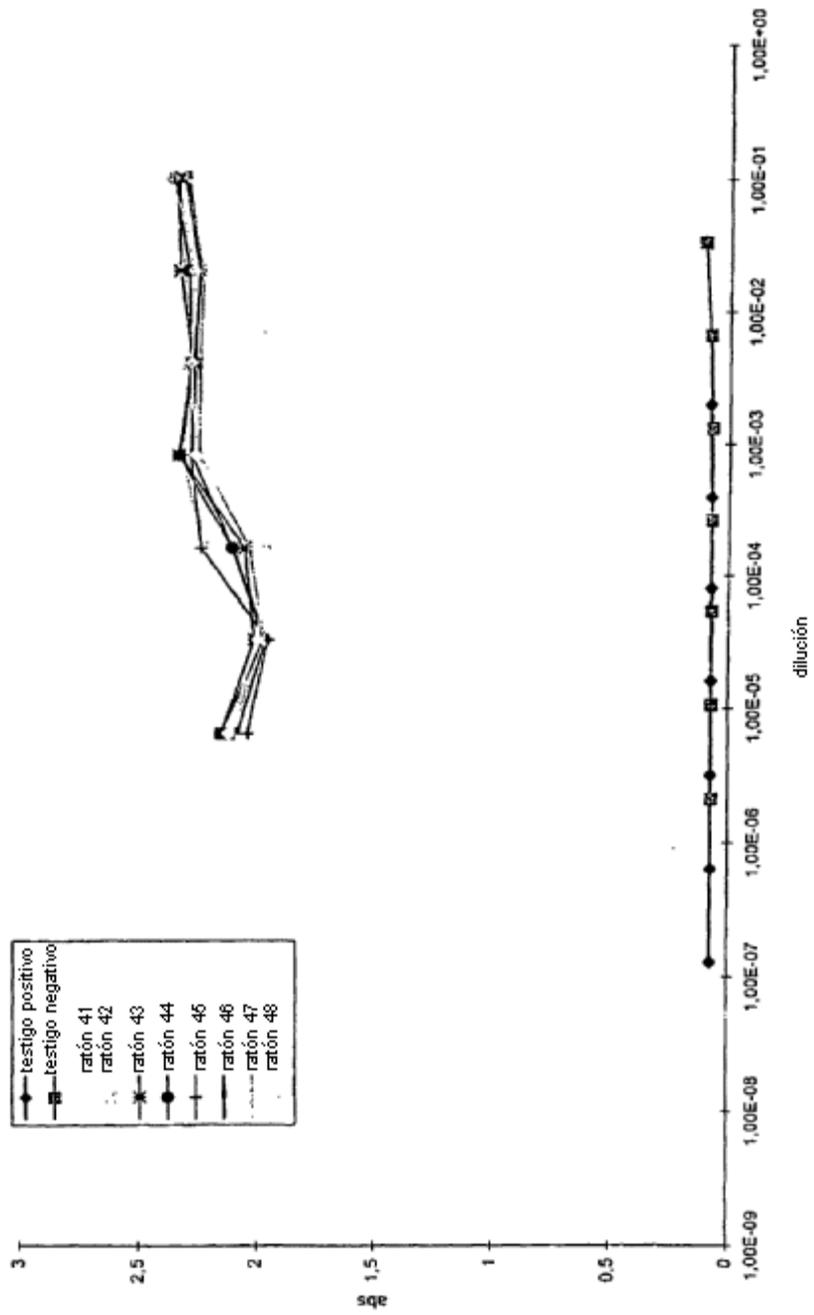


Figura 9

Respuesta de IgG2a el día 56 para
 ratones inmunizados p.o. con toxoide
 tetánico suspendido con Alhydrogel®

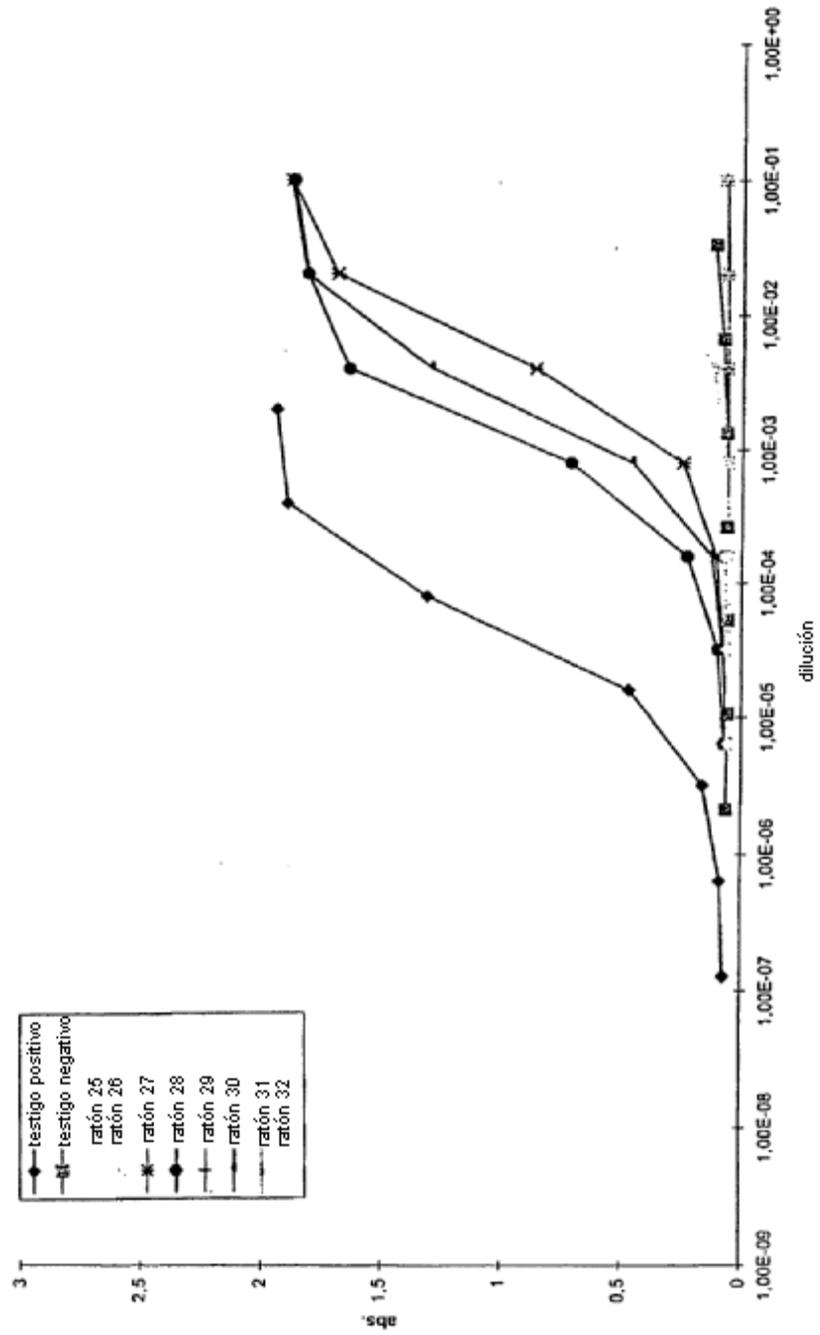


Figura 10

Respuesta de IgG2 el día 56 para
 ratones inmunizados p.o. con toxoide
 tetánico sin Alhydrogel®

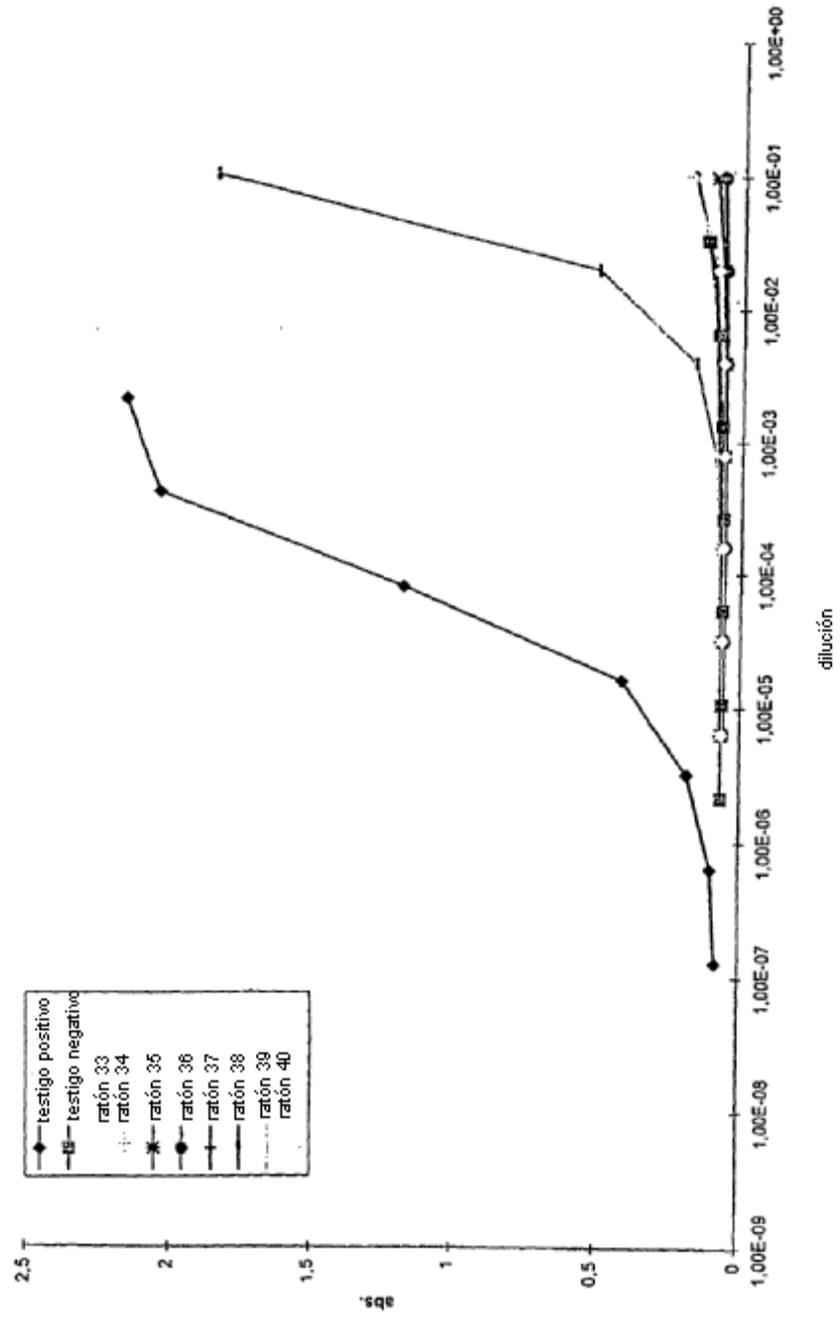


Figura 11

Respuesta de IgG2 el día 56 para
 ratones inmunizados i.p. con toxoide
 tetánico (grupo testigo)

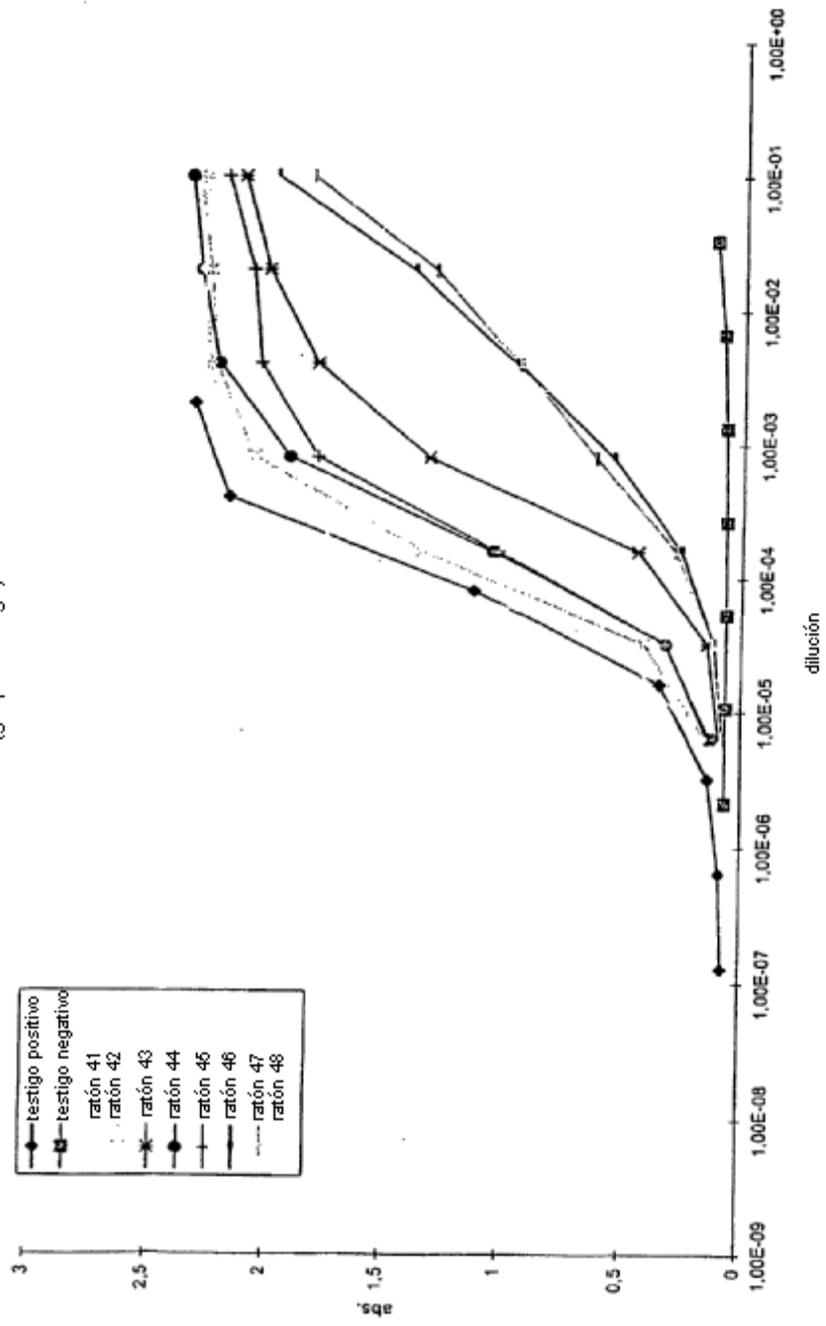


Figura 12

Respuesta de IgG1 el día 70 para ratones inmunizados p.o. con toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®

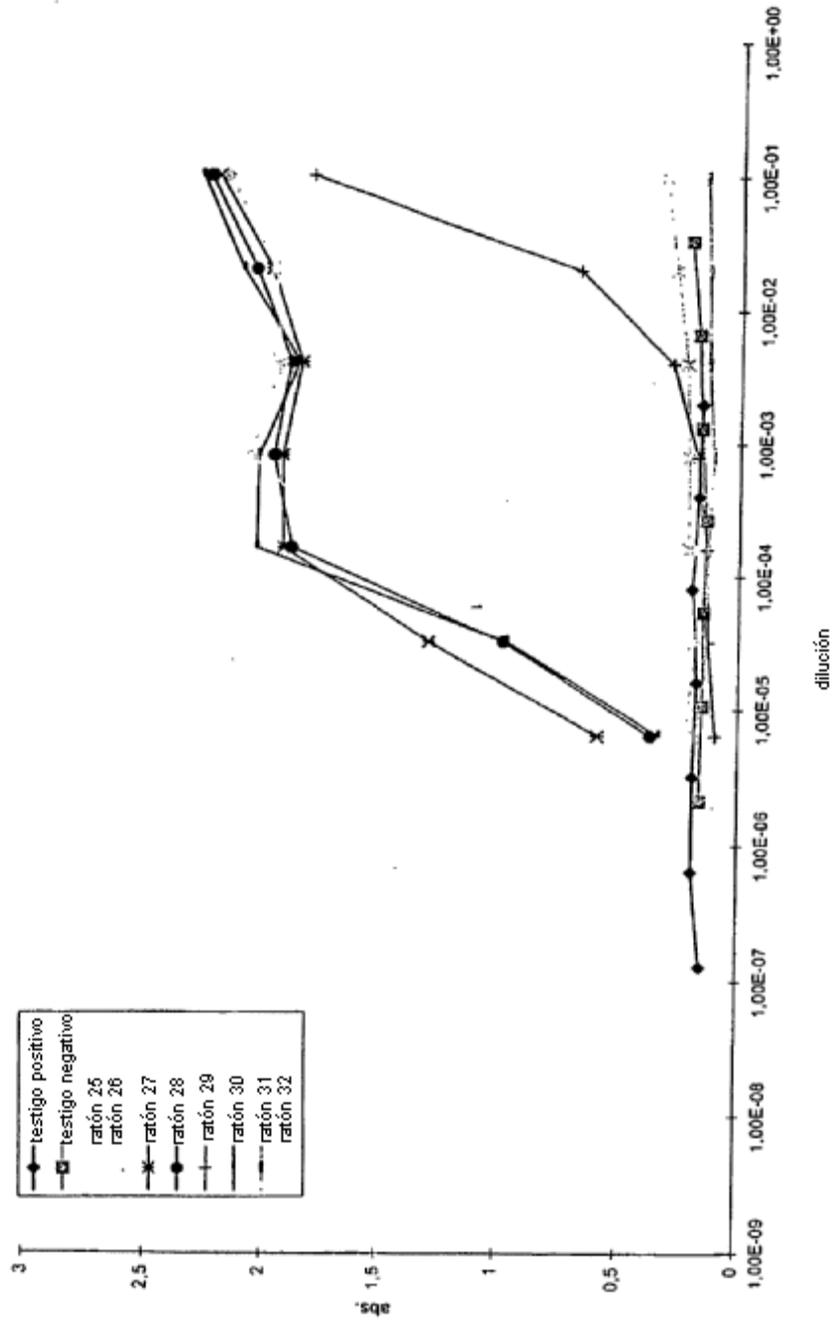


Figura 13

Respuesta de IgG1 el día 70 para
 ratones inmunizados p.o. con toxoide
 tetánico sin Alhydrogel®

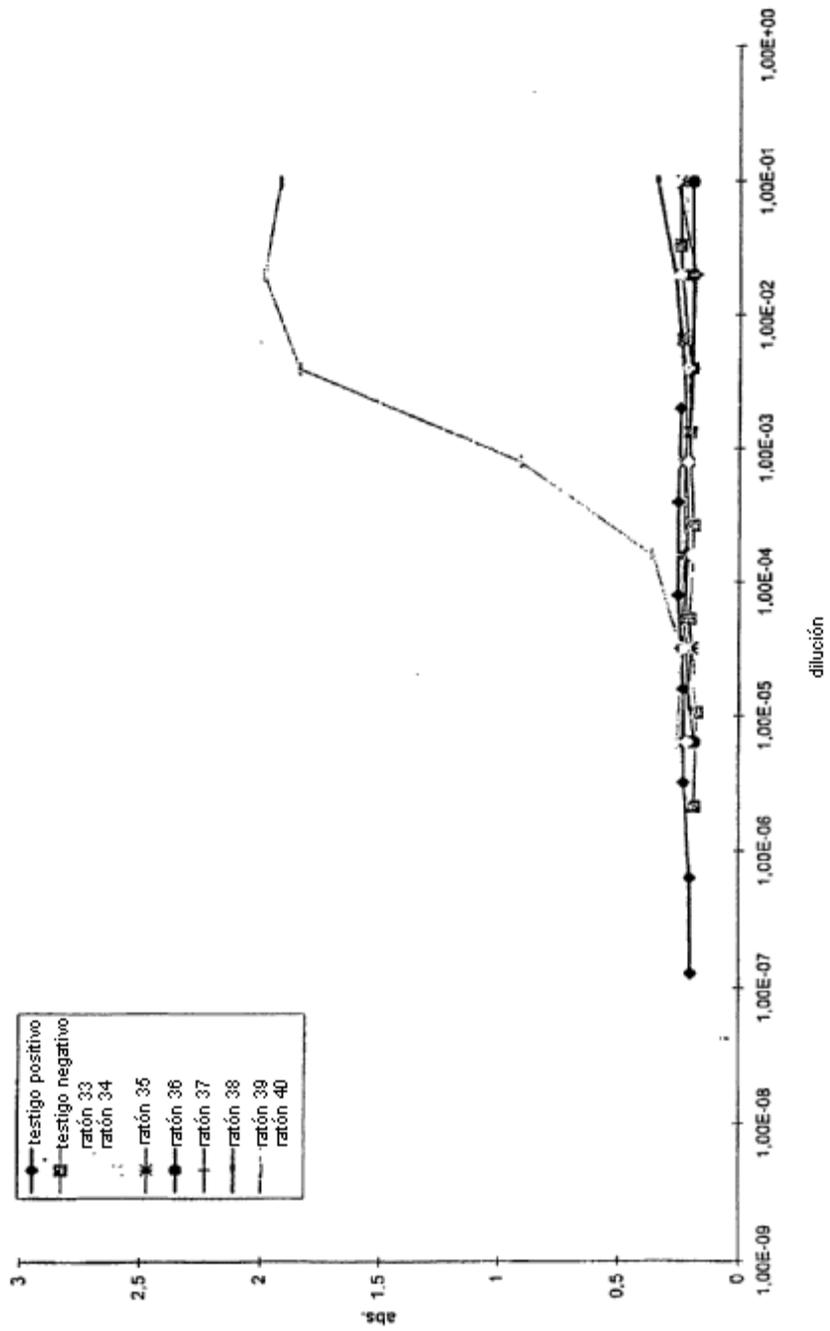


Figura 14

Respuesta de IgG2 el día 70 para
 ratones inmunizados i.p. con toxoide
 tetánico (grupo testigo)

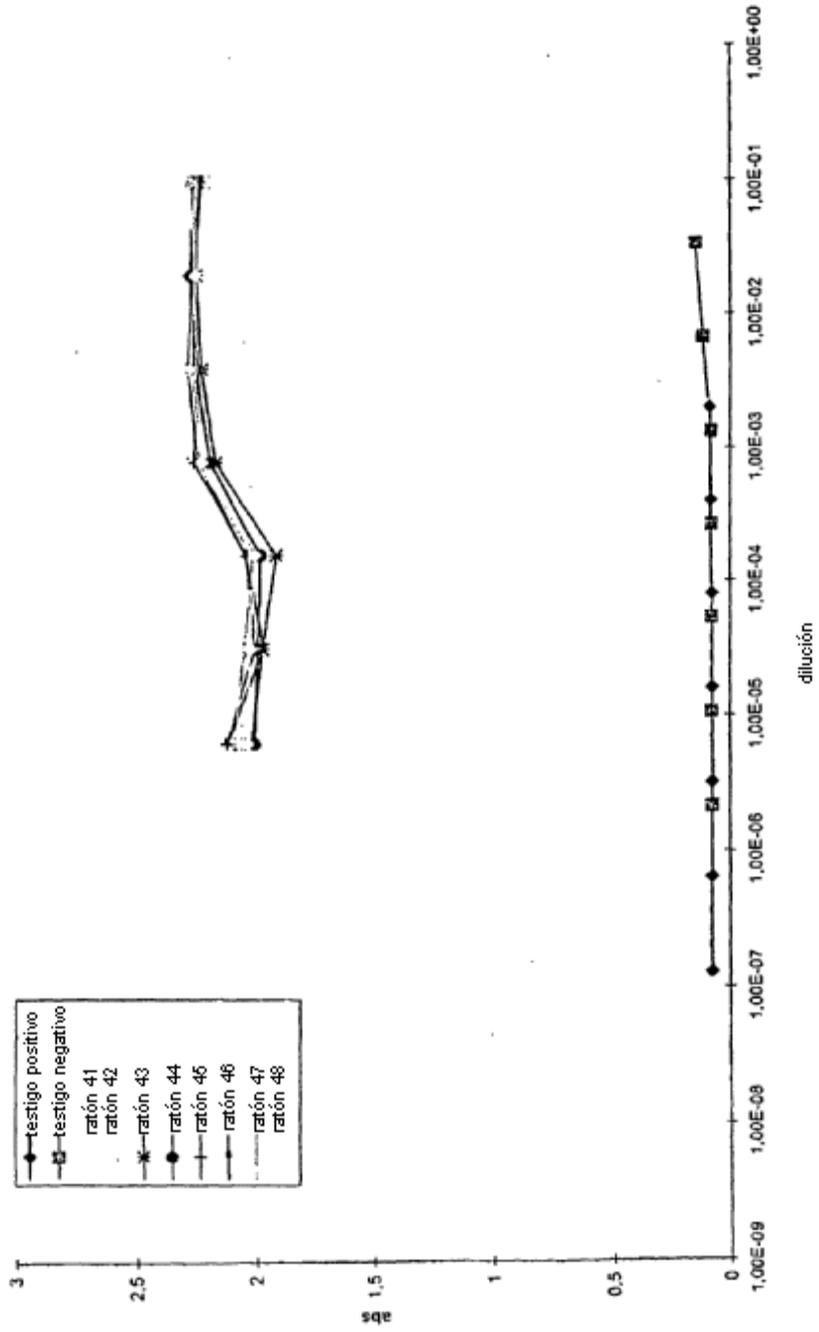


Figura 15

Respuesta de IgG2 el día 70 para ratones inmunizados p.o. con toxoide tetánico suspendido con Alhydrogel®

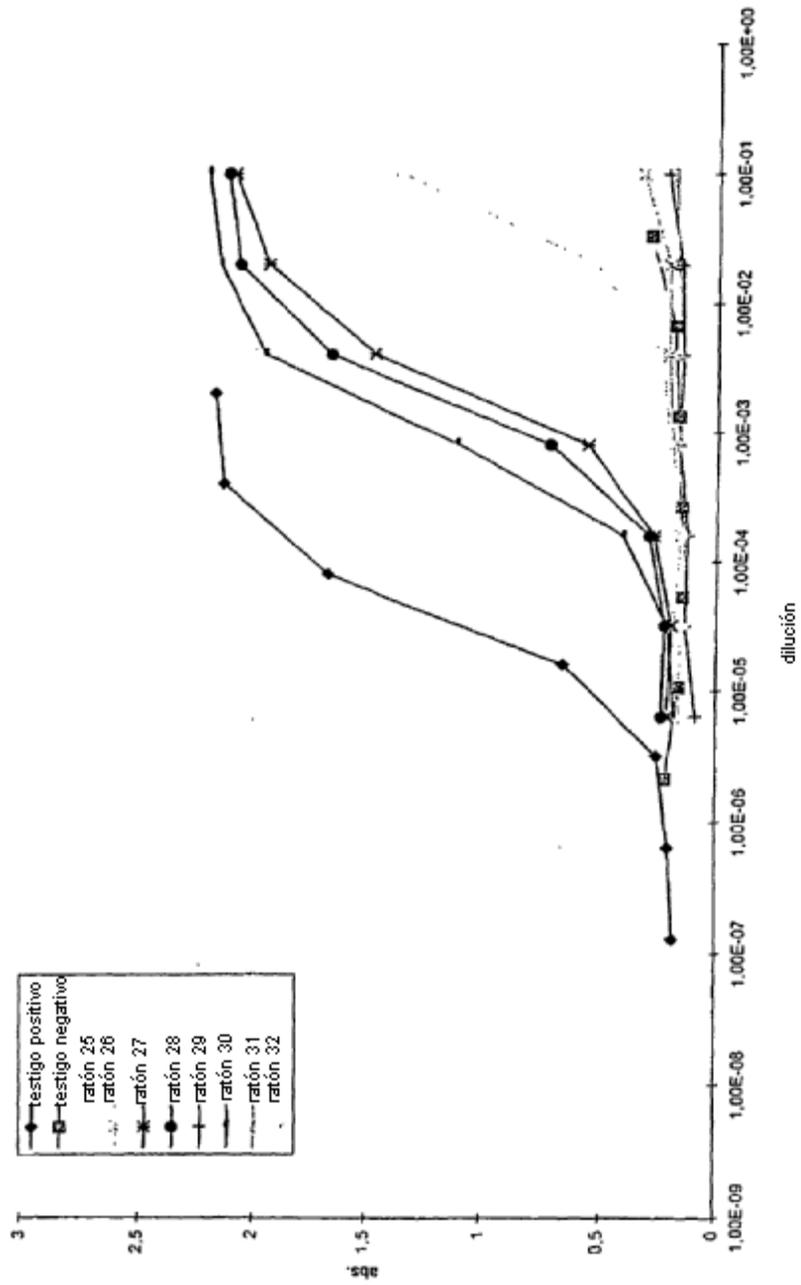


Figura 16

Respuesta de IgG2a el día 70 para
 ratones inmunizados p.o. con toxoide
 tetánico sin Alhydrogel®

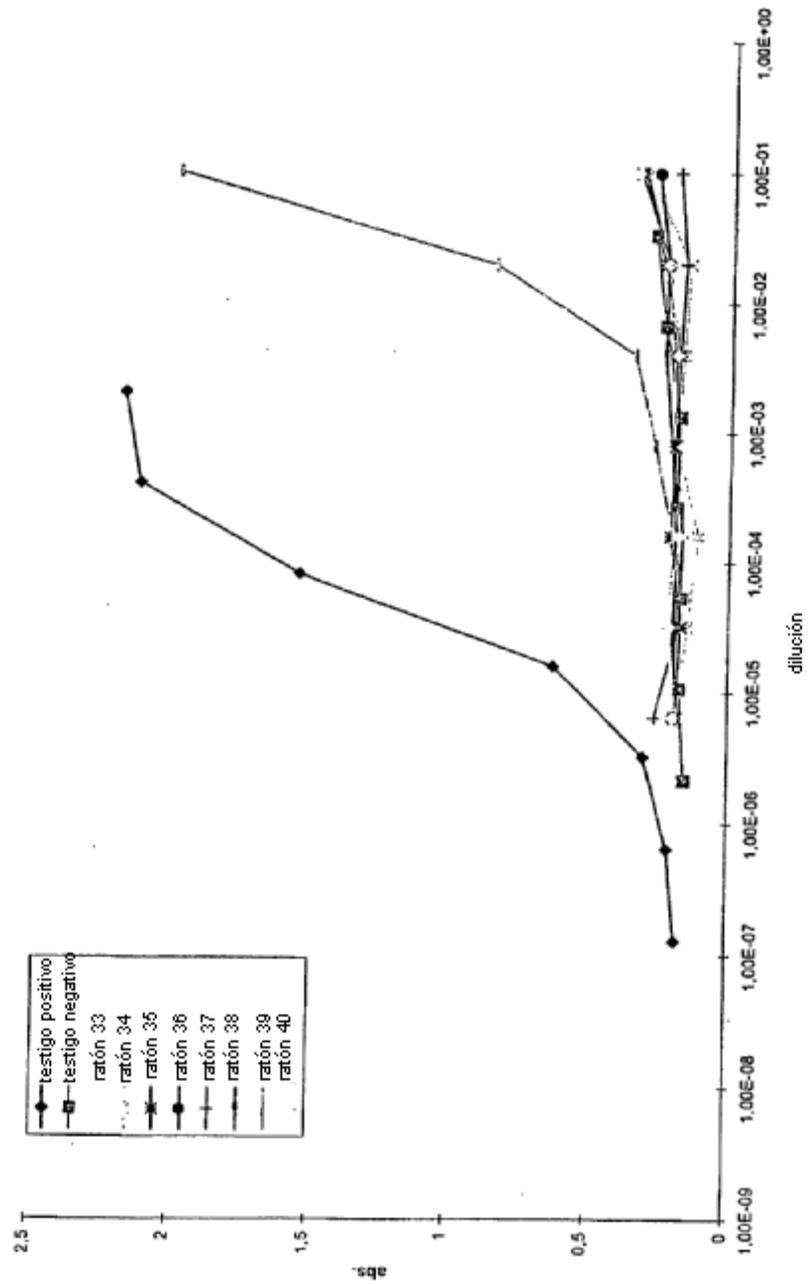


Figura 17

Respuesta de IgG2a el día 70 para
 ratones inmunizados i.p. con toxoide
 tetánico (grupo testigo)

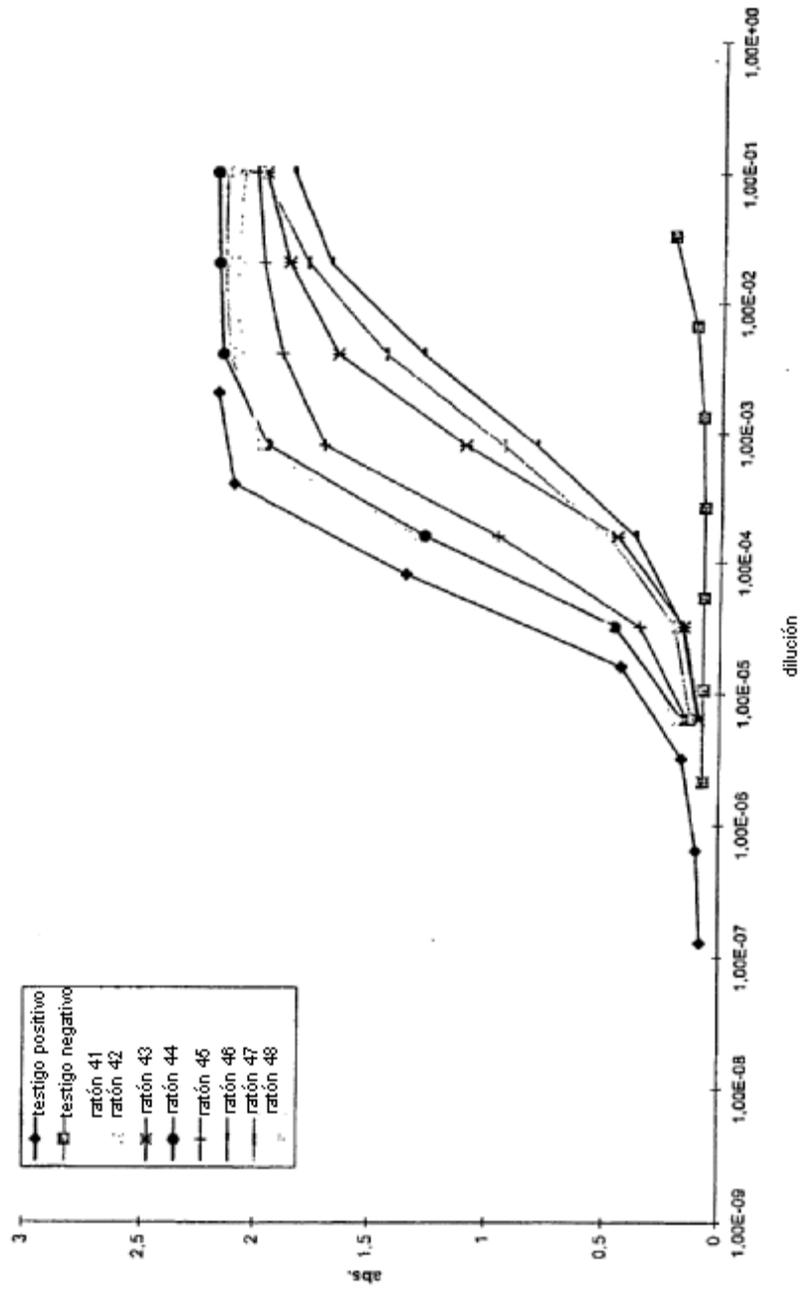


Figura 18

Respuesta de IgG1 el día 70 para ratones inmunizados p.o. con Phleum pratense suspendido con Alhydrogel®

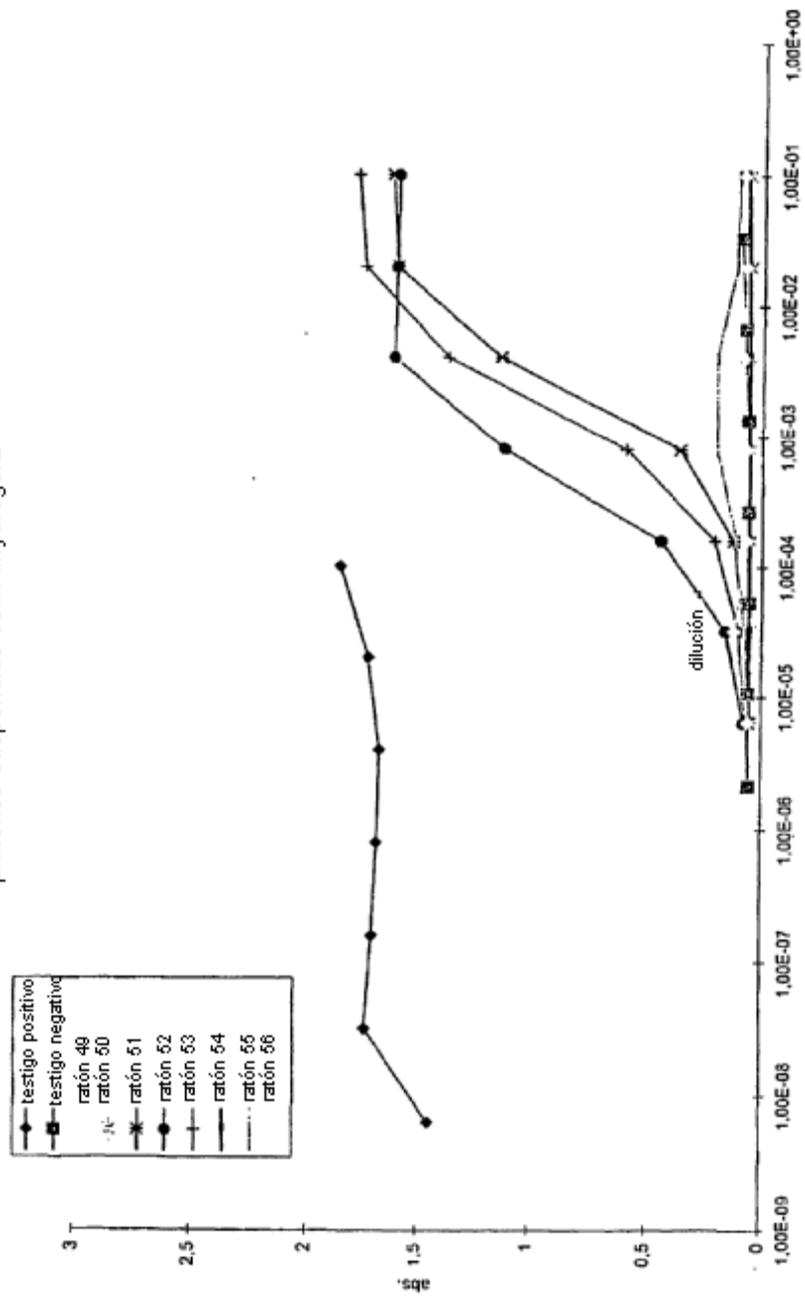


Figura 19

Respuesta de IgG1 el día 70 para
 ratones inmunizados p.o. con Phleum
 pratense sin Alhydrogel®

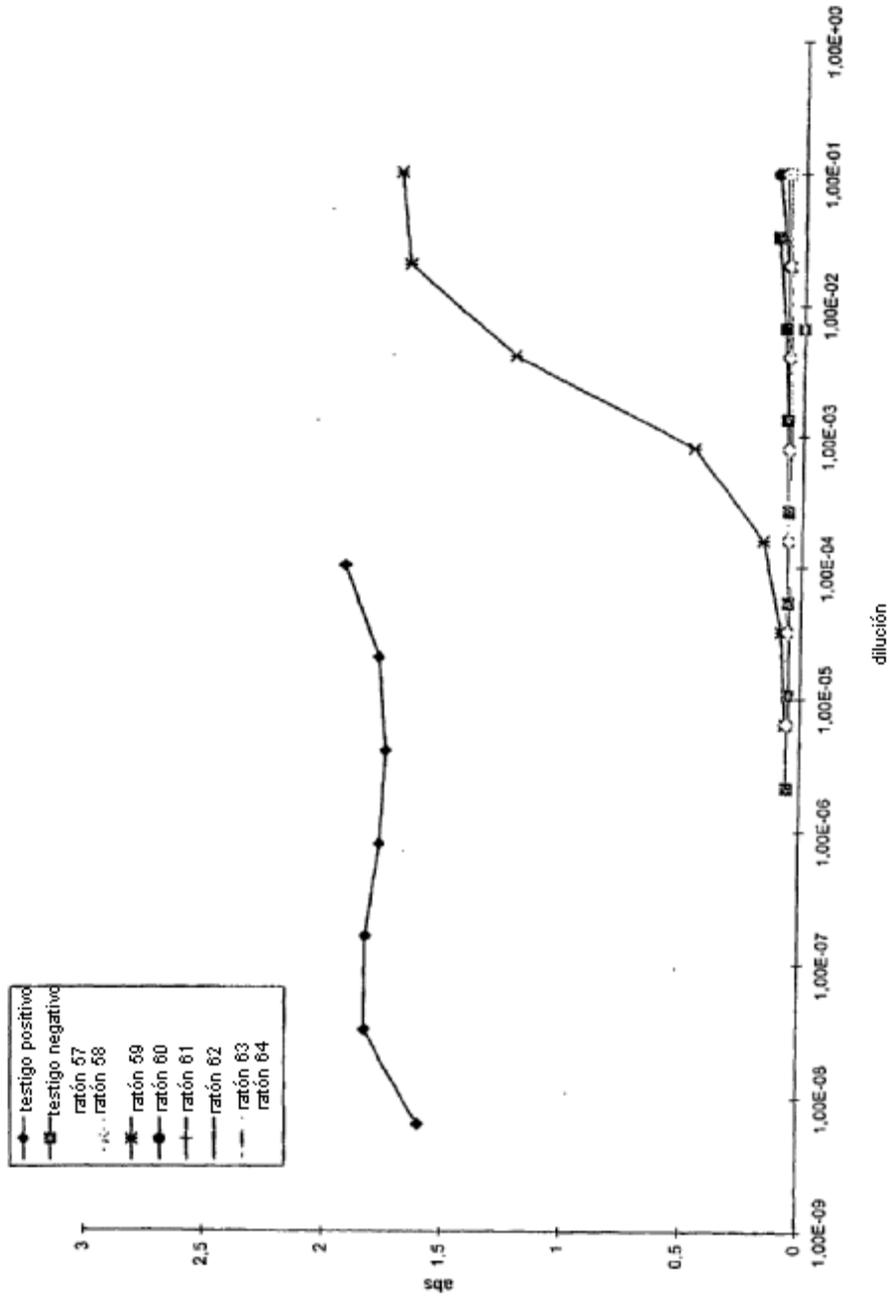


Figura 20

Respuesta de IgG1 el día 70 para
 ratones inmunizados i.p. con Phleum
 pratense (grupo testigo)

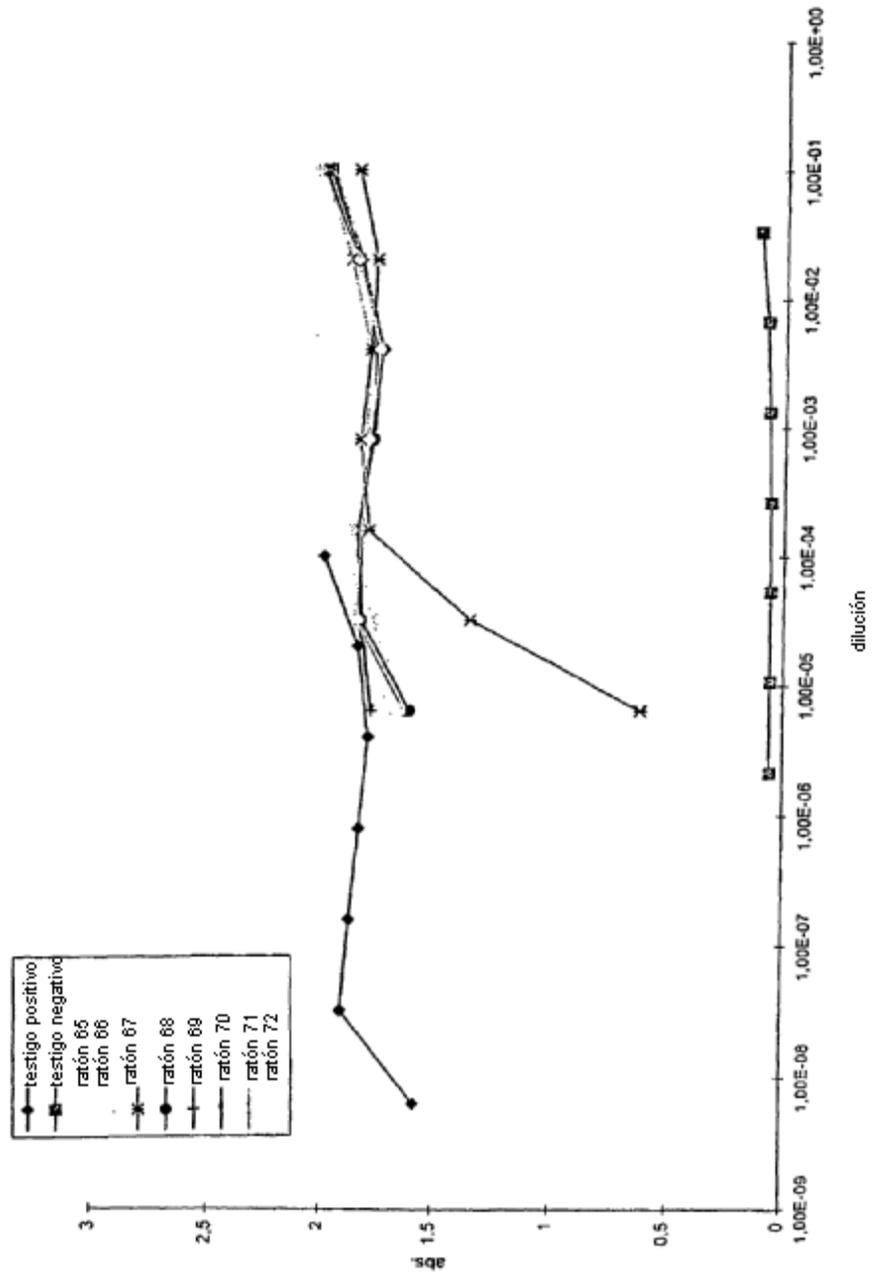


Figura 21

Respuesta de IgG2a el día 70 para
 ratones inmunizados p.o. con Phleum
 pratense suspendido con Alhydrogel®

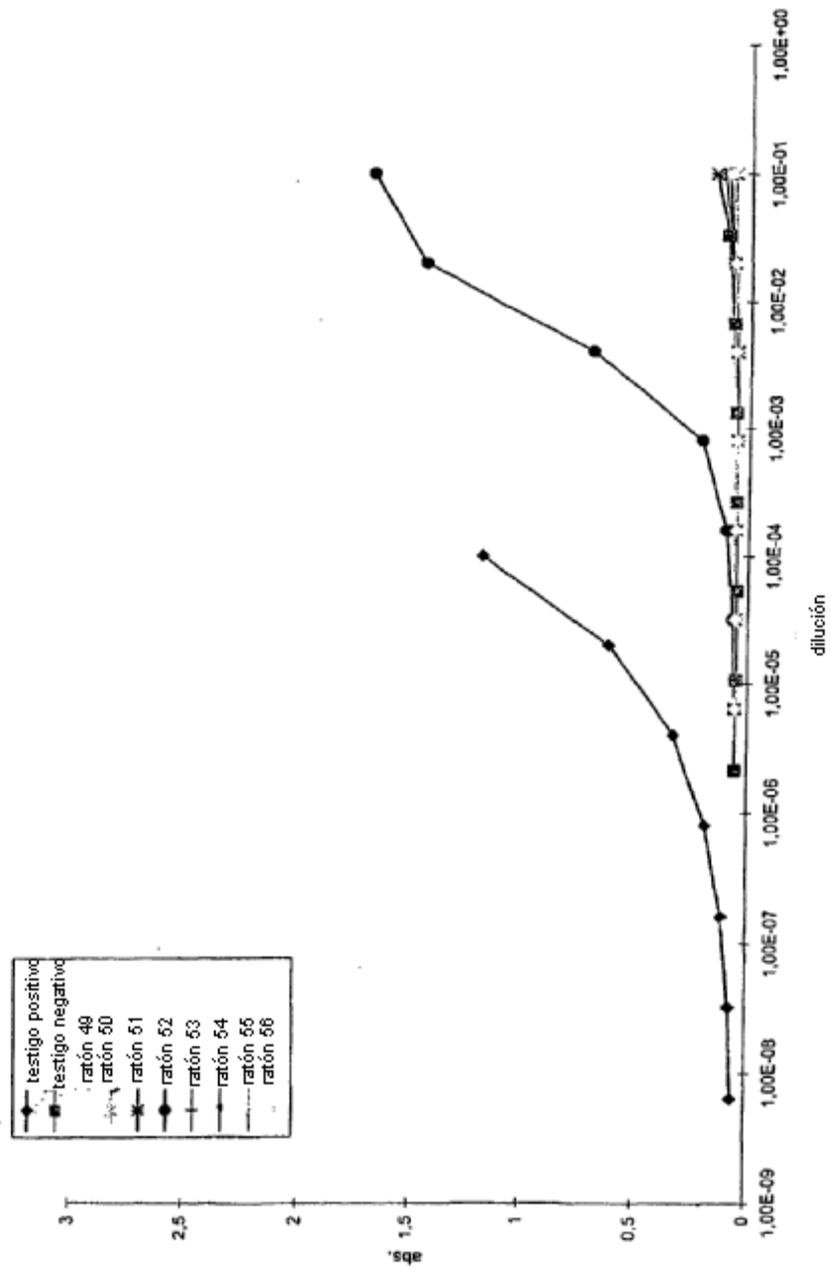


Figura 22

Respuesta de IgG2a el día 70 para
 ratones inmunizados p.o. con Phleum
 pratense sin Alhydrogel®

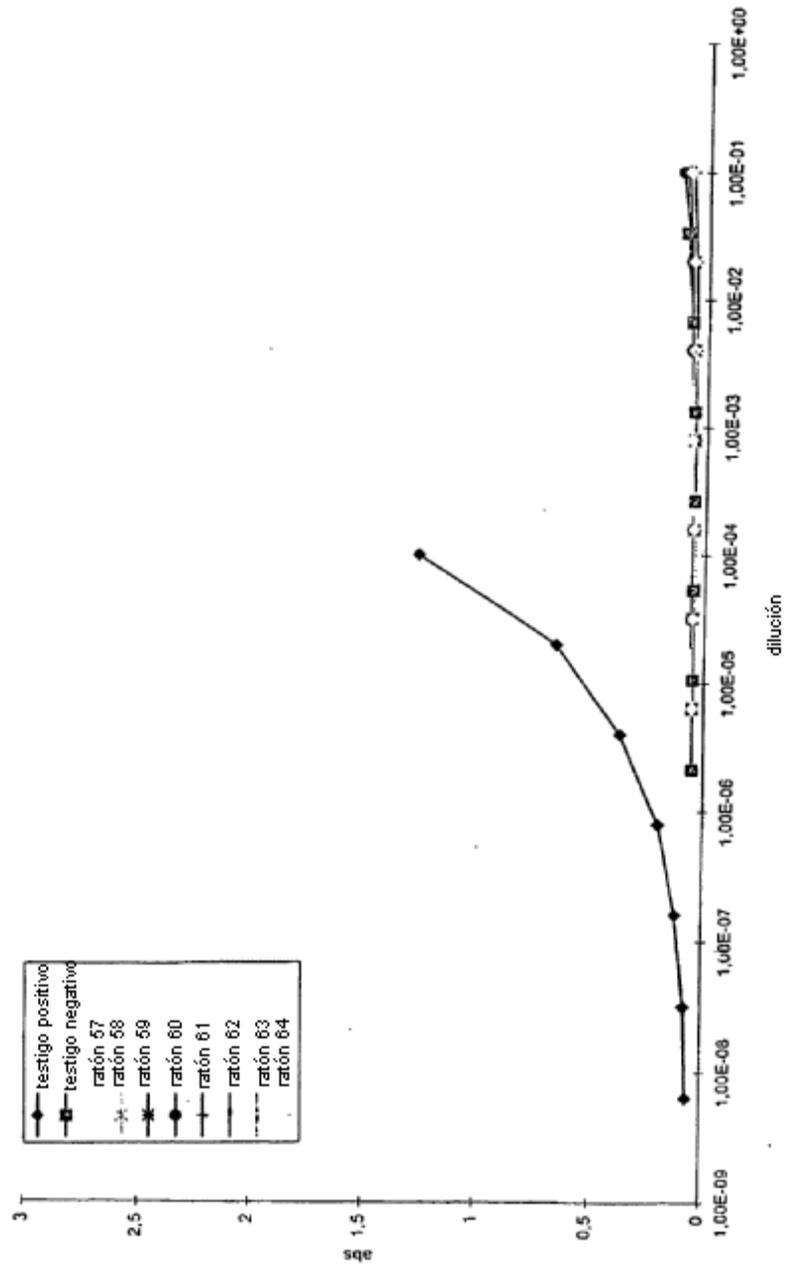


Figura 23

Respuesta de IgG2a el día 70 para
 ratones inmunizados i. p. con Phleum
 pratense (grupo testigo)

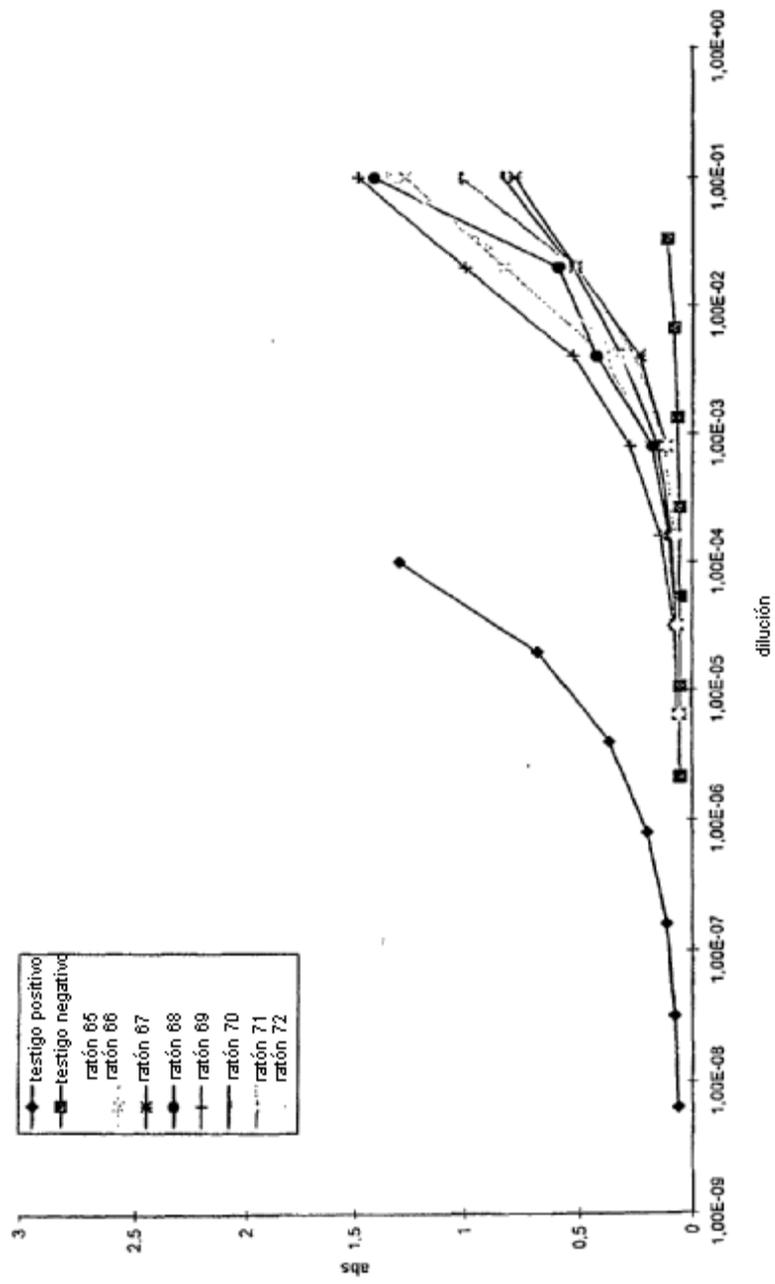


Figura 24

Figura25 Phl p, s.c. x4

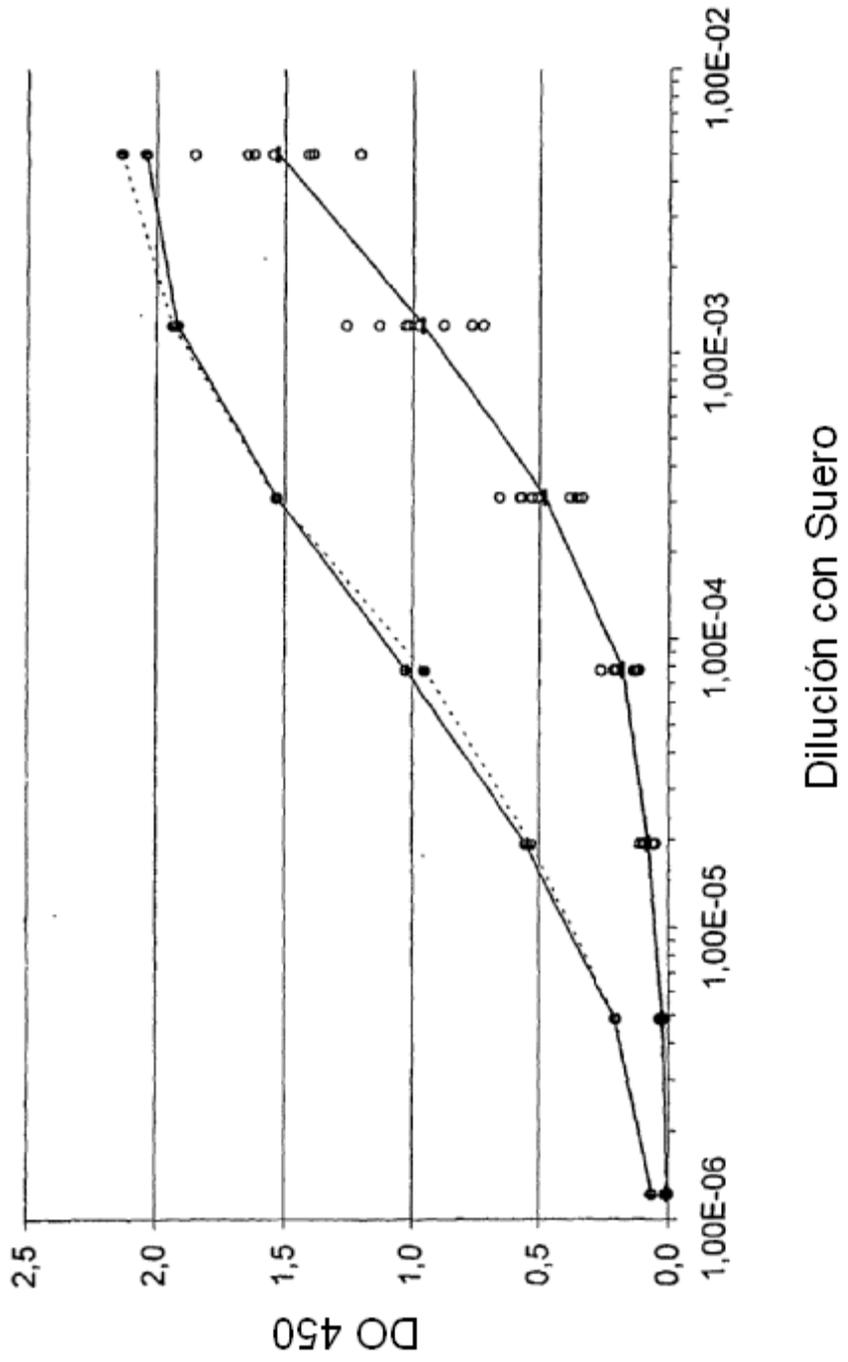


Figura 26 Phl p, s.c. x 1 + p.o x 3

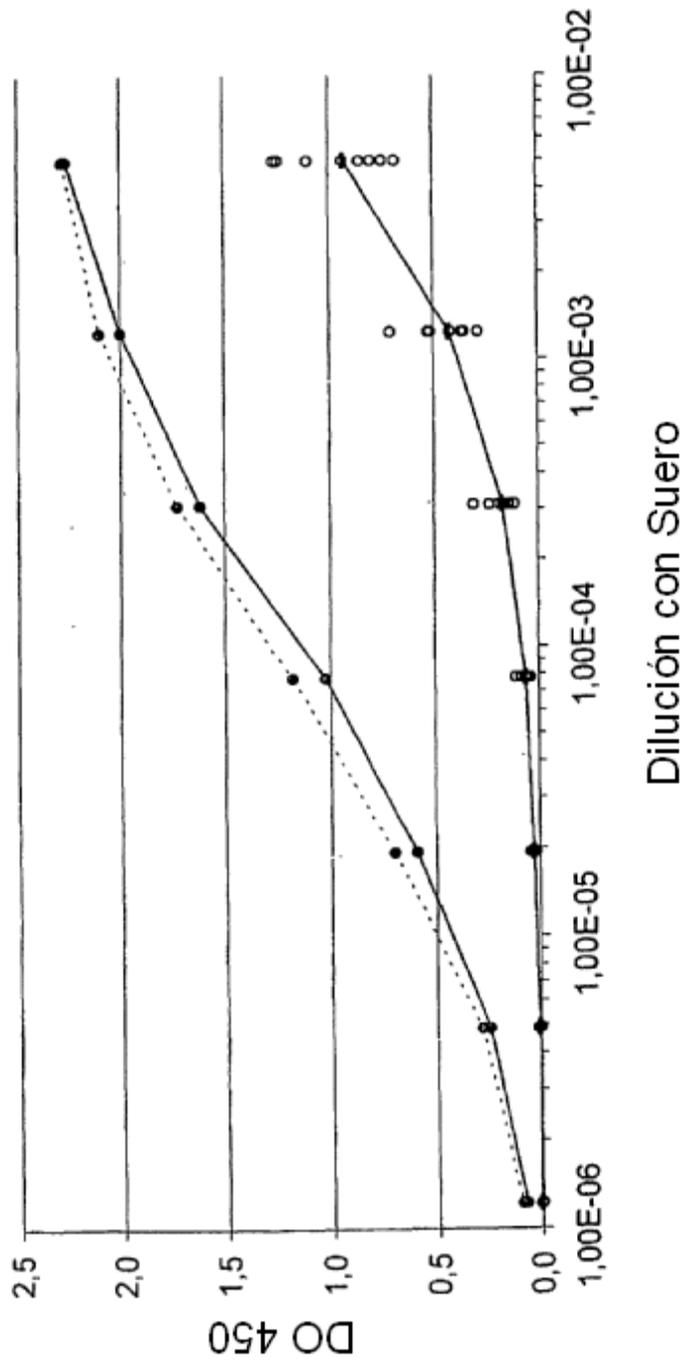


Figura 27 Phl p s.c. x 1 + Placebo p.o. x 3

