(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 372 592**

(51) Int. CI.:

A61K 39/39	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)
A61P 33/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **00921585 .6**

(96) Fecha de presentación: **10.04.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1165132**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

(54) Título: **FORMULACIÓN SECA PARA LA INMUNIZACIÓN TRANSCUTÁNEA.**

(30) Prioridad:
08.04.1999 US 128370 P
07.04.2000 US 545417

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.01.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.01.2012

(73) Titular/es:
INTERCELL USA, INC.
20 FIRSTFIELD ROAD SUITE 250
GAITHERSBURG, MD 20878, US

(72) Inventor/es:
Glenn, Gregory M. y
Scharton-Kersten, Tanya

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Formulación seca para la inmunización transcutánea

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

1. Campo de la Invención

Esta invención se refiere a una formulación seca útil para la inmunización transcutánea para inducir una respuesta inmune específica de antígeno. En particular, las formas físicas de la formulación seca incluyen artículos de fabricación como parches y otros sustratos sólidos (por ejemplo, un apósito) usados para aplicar la formulación seca en la piel del sujeto que la necesita. Esta formulación se estabiliza para almacenamiento y transporte y, sorprendentemente, la respuesta inmune inducida es más robusta que con formulaciones líquidas previas.

2. Descripción de la Técnica Relacionada

La piel, el mayor órgano humano, es una parte importante de la defensa del cuerpo frente a la invasión de agentes infecciosos y el contacto con sustancias nocivas (véase Bos, 1997). La piel, sin embargo, también puede ser una diana de infecciones crónicas en las que los organismos establecen su presencia eludiendo el sistema inmune.

La piel está compuesta por tres capas; la epidermis, la dermis y la grasa subcutánea. La epidermis está compuesta por las capas basal, espinosa, granulosa y cornificada; el estrato córneo comprende la capa cornificada y lípidos (Moschella y Hurley, 1992). Se ha indicado que las principales células presentadoras de antígeno de la piel, las células de Langerhans, están en las capas espinosas medias a superiores de la epidermis en los seres humanos. La dermis contiene principalmente tejido conectivo. Los vasos sanguíneos y linfáticos están confinados a la dermis y a la grasa subcutánea.

El estrato córneo, una capa de células muertas de la piel y lípidos, se ha visto tradicionalmente como una barrera frente al mundo hostil, excluyendo a los organismos y a las sustancia nocivas de las células viables que están por debajo del estrato córneo (Bos, 1997). La protección secundaria proporcionada por las células presentadoras de antígeno de la piel tales como las células de Langerhans se ha reconocido muy recientemente (Celluzzi y Falo, 1997). Además, la capacidad de inmunizar a través de la piel usando el concepto crucial de un adyuvante activo en la piel se ha descrito muy recientemente (Glenn et al., 1998). El reconocimiento científico de este importante avance en la vacunación fue rápido. "Es un resultado muy sorprendente y es magnífico", dijo el experto en vacunas Barry Bloom del Howard Hughes Medical Institute y el Albert Einstein College of Medicine en Nueva York, la estrategia parece "muy fácil, muy segura y ciertamente económica" (Noticias de la CNN, 26 de Febrero, 1998).

Otro resultado sorprendente fue la capacidad de usar una toxina como un adyuvante activo en la piel eficaz para la inmunización transcutánea sin efectos adversos para el huésped inmunizado.

Por ejemplo, *Vibrio cholerae* secreta la toxina del cólera (CT) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) secreta la enterotoxina sensible al calor (LT). Estas proteínas causan la secreción de fluido intestinal y diarrea masiva (Spangler, 1992) y son consideradas toxinas peligrosas.

Vibrio cholerae y la toxina del cólera (CT) son ejemplos de agentes infecciosos y de productos bacterianos nocivos, respectivamente, frente a los que podría haberse esperado una protección de la piel. Craig (1965) indicó que filtrados de heces de pacientes con cólera inyectados subcutáneamente en conejos o cobayas producían una aparición retardada característica, induración (hinchazón) edematosa sostenida, que se indujo por la presencia de la toxina en la piel. La hinchazón y la extravasación vascular fueron tan dramáticas que se atribuyeron a un factor de permeabilidad desconocido que posteriormente se mostró que era CT en sí misma. Así, se podría haber esperado razonablemente que CT fuera extremadamente reactogénica cuando se pusiera en la piel o se insertara a través del estrato córneo y causaría un enrojecimiento e hinchazón similares. El ensayo de Craig se convirtió en una medición estándar para la presencia y cantidad de CT en filtrados de heces o medio de cultivo. Datta confirmó que esta reactividad de la piel se debía a la toxina del cólera (véase Finkelstein y LoSpallutto, 1969).

Craig (1965) advirtió, "La ausencia de lesiones en la piel en el cólera clínico no descarta ciertamente la posibilidad de que el agente nocivo responsable del daño intestinal también pueda tener un efecto perjudicial en la piel siempre que se aplique en la piel en concentración suficiente". La extrema reactogenicidad de la toxina del cólera en la piel se usó como un ensayo para su toxicidad y dicha técnica anterior evidenció una expectación de que la toxina del cólera sería reactogénica si se aplicaba en la piel, produciendo una reacción indeseable.

En contraste, hemos mostrado que la toxina del cólera es inmunogénica, actuando tanto como antígeno como adyuvante, cuando se pone en la piel. Puede inmunizar sin ningún efecto secundario local o sistémico resultante. Esta ausencia de reactogenicidad cuando la toxina del cólera se pone en la piel para la inmunización transcutánea fue sorprendente y contradijo conclusiones que podrían haberse deducido de la técnica anterior. Una formulación líquida de CT puesta en la piel actuó como un adyuvante no tóxico, no reactogénico, en contraste con las expectativas de Craig, mientras que la inyección de CT en la piel resulta en hinchazón y enrojecimiento. Así, no era

obvio antes de nuestra invención que la toxina del cólera u otras exotoxinas que ADP-ribosilan serían útiles para la inmunización transcutánea Véanse WO 98/20734 y Pat. U.S. Nos. 5.910.306 y 5.980.898.

Esta expectativa de que la toxina del cólera u otros adyuvantes fueran altamente reactogénicos cuando se ponen en la piel fue apoyada adicionalmente por descubrimientos usando el adyuvante prototípico, adyuvante de Freund. Kleinau et al. (1994) encontraron que la administración tópica de adyuvante incompleto de Freund en la piel de ratas inducía artritis como se evidenciaba clínicamente y por la proliferación del recubrimiento de la articulación, infiltrados inflamatorios y destrucción del hueso y del cartílago. Además declararon, "Esta investigación se ha centrado en el papel artritogénico del aceite mineral, un prototipo para un adyuvante inmunológico. Es verosímil, sin embargo, que varios compuestos adicionales con propiedades adyuvantes también puedan tener el mismo efecto cuando se aplican percutáneamente (sic)". En contraste con esta sugerencia, hemos usado una emulsión agua-en-aceite de un adyuvante activo en la piel (LT) y hemos encontrado que induce de manera segura una respuesta inmune sin ningún efecto sistémico. Véanse WO 98/20734 y Pat. U.S. Nos. 5.910.306 y 5.980.898. Así, hubiera sido de esperar que la aplicación transcutánea de adyuvante, y especialmente un adyuvante en una emulsión, hubiera producido artritis en este modelo animal. Nuestros descubrimientos, sin embargo, mostraron de manera inesperada que dichas formulaciones carecían de reactogenicidad.

La inmunización transcutánea requiere tanto el paso del antígeno a través de las barreras exteriores de la piel, que se pensaba que eran impermeables a dicho paso, como una respuesta inmune frente al antígeno. *Contact Dermatitis* de Fisher declara que las moléculas de más de 500 daltons no pueden pasar normalmente a través de la piel. Además, según Hurley, "La piel debe su durabilidad a la dermis, pero su impermeabilidad química reside en la epidermis y casi exclusivamente en su capa muerta exterior, el estrato córneo".

Se conocen reacciones de la piel tales como dermatitis alérgica o atópica, pero la inducción de una respuesta inmune sistémica que provoca efectores inmunes específicos de antígeno y proporciona una ventaja terapéutica por la simple aplicación del inmunógeno en la piel no parece haberse enseñado o sugerido antes de nuestra invención.

Generalmente, las células presentadoras de antígeno (APC) de la piel, y particularmente las células de Langerhans, son dianas de agentes de sensibilización que resultan en patologías que incluyen dermatitis de contacto, dermatitis atópica, eccema y psoriasis. La dermatitis de contacto puede estar dirigida por las células de Langerhans que fagocitan el antígeno, migran a los ganglios linfáticos, presentan el antígeno y sensibilizan a las células T para la respuesta celular destructora intensa que ocurre en el sitio afectado de la piel (Kripke et al., 1987). Un ejemplo de dermatitis atópica es una enfermedad de la piel crónica inflamatoria con recaídas asociada con la colonización de la piel con *S. aureus* y se piensa que está causada por superantígenos derivados de S. aureus que desencadenan la inflamación crónica de la piel mediada por las células T a través de las células de Langerhans (Herz et al., 1998; Leung, 1995; Saloga et al., 1996a). La dermatitis atópica puede utilizar las células de Langerhans de una manera similar a la dermatitis de contacto y está asociada generalmente con altos niveles de anticuerpo IgE (Wang et al., 1996).

En contraste, la inmunización transcutánea con la toxina del cólera u otras exotoxinas relacionadas que ADP-ribosilan resultó en una nueva respuesta inmune con ausencia de descubrimientos de post-inmunización en la piel, altos niveles de anticuerpo IgG específico de antígeno, la presencia de anticuerpos de todas las subclases de IgG. Véanse WO 98/20734; Pat. U.S. Nos. 5.910.306 y 5.980.898; y Solic. U.S. No. 09/257.188.

Hay una publicación de Paul et al. (1995) sobre la inducción de lisis mediada por el complemento de liposomas sensibilizados con antígeno usando transferosomas. Los transferosomas se usaron como un vehículo para el antígeno y se ensayó la lisis mediada por el complemento de los liposomas sensibilizados con el antígeno. Se declaró que el límite para el paso a través de la piel por el antígeno era 750 daltons. Además, Paul y Cvec (1995) declararon que "es imposible inmunizar epicutáneamente con disoluciones simples de péptido o proteína". Así, la inmunización transcutánea como se describe en la presente memoria no se esperaría que ocurriera según este grupo.

Además de la restricción física de limitar el paso a través de la piel de bajo peso molecular, se creía que el paso de polipéptidos estaba limitado por restricciones químicas. Carson et al, (Pat. U.S. No. 5.679.647) declararon que "se cree que la biodisponibilidad de los péptidos después de la transmisión transdérmica o mucosal está limitada por la concentración relativamente alta de proteasas en estos tejidos. Todavía, desafortunadamente, no están disponibles medios fiables para administrar péptidos...por la transmisión transdérmica o mucosal de genes que los codifican."

En contraste con la inmunización transcutánea, la terapia transdérmica con fármacos se ha considerado para tomar como diana la vasculatura encontrada en la dermis. Por ejemplo, Moschella (1996) declara, "Las ventajas de la terapia transdérmica sobre la administración oral convencional incluyen: 1. Evasión de perfiles de concentración plasmáticos "pico y valle". 2. Evasión de metabolismo de primer paso en el tracto gastrointestinal y el hígado" (énfasis añadido). Así, en el entorno de la administración de fármacos, el significado de transdérmico es pasar a través de la epidermis y en la dermis o capas inferiores para conseguir la adsorción en la vasculatura.

En muchos casos, la inmunización eficaz que da lugar a la protección requiere ayuda en la forma de adyuvantes para el antígeno o plásmido coadministrado y, por lo tanto, las respuestas inmunes útiles requieren el uso de un

adyuvante para potenciar la respuesta inmune (Stoute et al., 1997; Sasaki et al., 1998). En WO 98/20734 y un artículo posterior (Scharton- Kersten et al., Infec. Immun., en prensa), mostramos que un adyuvante activo en la piel se requería para inducir altos niveles de anticuerpos sistémicos y mucosales frente a antígenos coadministrados. Por ejemplo, los ratones inmunizados con CT + DT inducían altos niveles de anticuerpos anti-DT sistémicos y mucosales. Se sabe que los anticuerpos se correlacionan con protección frente a la difteria. Así, puede esperarse que el adyuvante de la piel para la inmunización transcutánea proporcione "ayuda" en la respuesta inmune frente al antígeno coadministrado y juegue un papel crítico en la inducción de una respuesta inmune útil.

Dichas referencias explican por qué nuestro uso exitoso de una molécula como la toxina del cólera (que tiene 85.000 daltons) como un antígeno-adyuvante en la inmunización fue recibido con entusiasmo y sorpresa por la técnica porque no se esperaba que dichas moléculas grandes pasaran a través de la piel y, por lo tanto, no se hubiera esperado que indujeran una respuesta inmune fuerte, específica.

Hemos mostrado en WO 98/20734; Pat. U.S. Nos. 5.910.306 y 5.980.898; y Solic. U.S. No. 09/257.188 que el uso de una exotoxina que ADP-ribosila, tal como la toxina del cólera, enterotoxina sensible al calor de *E. coli* (LT), exotoxina A de *Pseudomonas* (ETA) y toxina pertussis (PT), podría provocar una respuesta inmune vigorosa que fue altamente reproducible. Además, cuando dicha exotoxina que ADP-ribosila se usó como un adyuvante y se aplicó en la piel junto con un antígeno separado (por ejemplo, albúmina de suero bovino o toxoide de la difteria) en una disolución salina, pudo provocarse una respuesta inmune específica de antígeno sistémica y mucosal.

Tomando como base este éxito, ahora abordamos los problemas de mantener la actividad de una vacuna sometida a condiciones duras durante el almacenamiento o el transporte y mantener la esterilidad de una formulación de vacuna preparada en el campo. Se necesitaba una formulación que pudiera almacenarse y transportarse sin almacenamiento en frío y que minimizara el peligro de contaminación eliminando la necesidad de mezclar disoluciones en el campo.

Actualmente, las vacunas autorizadas se administran en una disolución o suspensión acuosa y se administran por la ruta intramuscular u oral durante la inmunización. Los inconvenientes de mezclar los componentes de la vacuna con agua o tampones bajo condiciones de esterilidad cuestionable y la posibilidad de que los antígenos en la disolución se degraden son muy conocidos y, en parte, han dado lugar a la necesidad de almacenamiento en frío de los componentes de las vacunas. Los componentes de las vacunas en presencia de agua son químicamente menos estables y más propensos a la contaminación por la provisión de un medio acuoso para el crecimiento de las bacterias. El requerimiento estricto de almacenamiento en frío durante el transporte y almacenamiento de las vacunas ha dado lugar a la "cadena de frío", lo que indica que en todo momento después de la fabricación de la vacuna, la vacuna se mantiene en condiciones de almacenamiento en frío apropiadas. Esto incrementa la complejidad del almacenamiento de la vacuna, crea problemas logísticos cuando se transporta la vacuna y aumenta mucho al coste de la vacunación. Un estudio publicado por John *et al* (1996) ilustra los problemas y costes del mantenimiento de la cadena de frío:

"Las coberturas de la inmunización infantil de 80-85% se han vuelto sostenibles en el mundo en vías de desarrollo. El mercado de las vacunas es enorme en los países en vías de desarrollo; en 1992, el consumo total de dosis de vacunas ascendió a 2.207 millones. Sólo hubo 127 millones de nacimientos y las dosis reales proporcionadas a los niños deberían haber sido menores de 1.000 millones. Esto indica un desperdicio inmenso, que podría ahorrarse si las vacunas fueran más estables a altas temperaturas y no se contaminaran".

Los presentes inventores han demostrado previamente (WO 98/20734 y Glenn *et al*, Infection and Immunity 67, 1100-1106, 1999) que las formulaciones acuosas que comprenden exotoxinas bacterianas que ADP-ribosilan o sus subunidades aplicadas en la piel intacta pueden actuar como adyuvantes para potenciar la respuesta inmune frente a antígenos administrados transcutáneamente.

Vasell *et al* (*FASEB J. 13, A633, 1999*) describieron la activación de las células de Langerhans en la piel después de la inmunización transcutánea.

WO 98/42375 describe mutantes destoxificados de varias exotoxinas bacterianas que ADP-ribosilan, especialmente aquellas de pertussis (PT), cólera (CT) y E. coli (LT) y su uso como adyuvantes parenterales.

EP 0891 770 describe la preparación de una disolución etanólica de un antígeno peptídico de bajo peso molecular, que se aplica a cinta adhesiva y se seca. La cinta está concebida para inmunización transcutánea. La formulación no comprende ningún adyuvante.

En nuestro trabajo sobre inmunización transcutánea que se ha descrito previamente, hemos inmunizado con una formulación en forma líquida: como una disolución, suspensión, gel, emulsión o preparación de liposomas. Ahora hemos descubierto que una forma seca de la formulación puede usarse con éxito y, sorprendentemente, la respuesta inmune puede ser más robusta que la inmunización con formulaciones líquidas.

Éstas y otras ventajas de la invención se discuten más adelante.

DESCRIPCIÓN BREVE DEL DIBUJO

Un parche ejemplar de la invención se muestra en la Fig. 1. La formulación de la invención puede aplicarse a gasa (**1**) adherida en un soporte (**2**) como una unidad circular de 1 cm^2 de diámetro. La unidad circular está adherida a un apósito rectangular (**3**) para formar un parche que puede aplicarse en la piel de un sujeto con el lado de la gasa en contacto con la piel, adherida a ésta por el adhesivo expuesto y cubierta por el lado del apósito. El parche se empaqueta asépticamente y puede almacenarse a temperatura ambiente envuelto en un revestimiento antiadherente (**4**) en el lado de la gasa y papel de embalaje (**5**) en el lado del apósito. Los componentes pueden mantenerse en yuxtaposición cercana por laminados adhesivos, excepto para los envoltorios del parche. El espesor y otras dimensiones del parche no están representados a escala.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la invención es proporcionar un sistema mejorado para la inmunización transcutánea que induce una respuesta inmune (por ejemplo efector humoral y/o celular) en un animal o ser humano. El sistema de administración proporciona una aplicación simple de una formulación que comprende un antígeno y adyuvante o polinucleótido (que codifica el adyuvante o el antígeno) en la piel de un sujeto, induciendo de esta manera una respuesta inmune específica frente a un antígeno. Lo más importante, al menos un ingrediente o componente de la formulación (es decir, antígeno o adyuvante) se proporciona en forma seca antes de la administración de la formulación.

Por ejemplo, la activación del antígeno, adyuvante o célula presentadora de antígeno puede ayudar en la presentación del antígeno por las células inmunes. La activación puede estimular el contacto entre la formulación y una célula presentadora de antígeno del sistema inmune (por ejemplo, células de Langerhans en la epidermis, células dendríticas dérmicas, células dendríticas foliculares, macrófagos, células B) y/o inducir a la célula presentadora de antígeno para que capte la formulación; la célula presentadora de antígeno presentará entonces el antígeno a un linfocito. En particular, la célula presentadora de antígeno puede migrar desde la piel a los ganglios linfáticos y presentar el antígeno a un linfocito, induciendo de esta manera una respuesta inmune específica de antígeno. Además, la formulación puede ponerse en contacto directamente con un linfocito que reconoce el antígeno, induciendo de esta maneta una respuesta inmune específica de antígeno.

Además de provocar reacciones inmunes que dan lugar a la activación y/o expansión de una población de células B y/o T específica de antígeno, incluyendo un linfocito T citotóxico (CTL), otro objeto de la invención es regular positivamente y/o negativamente componentes del sistema inmune usando el sistema de inmunización transcutánea para influir en los subconjuntos de células T específicas de antígeno colaboradoras (Th1 y/o Th2) o de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). Esto puede ejemplificarse por el diferente comportamiento de CT y LT que puede resultar en diferentes respuestas de T colaboradoras. La respuesta inmune deseada es preferiblemente sistémica o regional (por ejemplo, mucosal) pero no una reacción alérgica, dermatitis, eccema, psoriasis u otra reacción atópica. Se esperaría que estas respuestas inmunes pudieran dar lugar a respuestas inmunes protectoras tales como anticuerpos anti-toxoide tetánico para el tétanos o anticuerpos anti-difteria para la difteria.

La invención puede ponerse en práctica sin perforar la piel. Por ejemplo, puede ponerse en práctica con un incremento químico o físico de la penetración. Por ejemplo, limpiando la piel con una disolución acuosa (por ejemplo, agua, disoluciones salinas y tamponadas), alcohol (por ejemplo, alcohol isopropílico), polietilen glicol y glicerol, o incorporando los mismos en la formulación, puede actuar como un potenciador químico de la penetración. Alternativamente, la aplicación de la formulación en la piel intacta no implica energía física, eléctrica o sónica no está implicada para perforar las capas de la piel inferiores al estrato córneo.

Otro objeto de la invención es proporcionar formulaciones útiles para la inmunización y vacunación, así como procesos para su fabricación. Una formulación seca se almacena y se transporta más fácilmente que las vacunas convencionales, rompe la cadena de frío requerida desde el lugar de fabricación de la vacuna hasta el escenario donde se produce la vacunación. Sin estar limitado a ningún modo de acción particular, otra manera en la que una formulación seca puede ser una mejora sobre las formulaciones líquidas es que pueden conseguirse altas concentraciones de un ingrediente activo seco de la formulación (por ejemplo, el antígeno y el adyuvante) solubilizando directamente en el sitio de la inmunización durante un periodo corto de tiempo. La humedad de la piel y un apósito oclusivo pueden acelerar este proceso. De esta manera, es posible que pueda conseguirse una concentración que se acerque al límite de solubilidad del ingrediente activo in situ. Alternativamente, el ingrediente seco, activo de la formulación per se puede ser la mejora proporcionando una forma en partículas sólida que es captada y procesada por las células presentadoras de antígeno. Estos posibles mecanismos se discuten no para limitar el alcance de la invención o sus equivalentes, sino para permitir comprender la operación de la invención y para guiar el uso de esta formulación en la inmunización y la vacunación.

La formulación seca de la invención puede proporcionarse en varias formas. Un "parche" se refiere a una realización que incluye un sustrato sólido (por ejemplo, apósito médico) así como al menos un ingrediente activo. Otras realizaciones son polvos finos o granulados, películas secas uniformes, gránulos y comprimidos. La formulación puede disolverse y secarse en una ampolla o una superficie plana (por ejemplo, la piel) o simplemente espolvorearse en la superficie plana. Puede secarse al aire, secarse con temperatura elevada, liofilizarse o secarse por pulverización, recubrirse o pulverizarse sobre un sustrato sólido y secarse, espolvorearse en un sustrato sólido,

congelarse rápidamente y secarse lentamente en vacío, o combinaciones de éstos. Si en la formulación hay diferentes moléculas como ingredientes activos, pueden mezclarse en disolución y secarse, o mezclarse sólo en la forma seca. Los compartimentos o cámaras del parche pueden usarse para separar los ingredientes activos de manera que sólo uno de los antígenos o adyuvantes se mantenga en forma seca antes de la administración; la separación del líquido y del sólido de esta manera permite el control en el tiempo y la velocidad de disolución del al menos un ingrediente seco activo. Opcionalmente, la formulación puede incluir excipiente, estabilizador, desecador, conservante, adhesivo, materiales del parche o combinaciones de éstos.

La formulación puede fabricarse bajo condiciones asépticas con prácticas aceptables para los organismos reguladores apropiados (por ejemplo la Food and Drug Administration) para productos biológicos y vacunas.

Una realización de la invención es proporcionar una dosis única o unitaria de la formulación para la administración. La cantidad de antígeno o adyuvante en la dosis unitaria puede estar en cualquier lugar en un intervalo amplio de aproximadamente 0,1 μg a aproximadamente 10 mg. Se prefiere el intervalo de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 1 mg, se prefiere más el intervalo de aproximadamente 10 μg a aproximadamente 500 μg. Otros intervalos adecuados son entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 10 μg, entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 50 μg, entre aproximadamente 50 μg y aproximadamente 200 μg y entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 5 mg. La proporción entre el antígeno y el adyuvante puede ser 1:1 (por ejemplo, CT cuando es tanto antígeno como adyuvante) pero pueden ser adecuadas proporciones mayores para antígenos débiles o pueden usarse proporciones menores de adyuvante a antígeno.

Más adelante se describen realizaciones adicionales de la invención.

En una realización de la invención, una formulación que comprende adyuvante y antígeno se aplica en la piel de un sujeto infectado, el antígeno se presenta a las células inmunes y se induce una respuesta inmune específica de antígeno. La formulación puede contener sólo antígeno sin adyuvante adicional, si la antigenicidad de la formulación es suficiente y no requiere actividad adyuvante. La formulación puede incluir un antígeno adicional de manera que la aplicación de la formulación induce una respuesta inmune frente a múltiples antígenos. En dicho caso, los antígenos pueden obtenerse o no de la misma fuente, pero los antígenos tendrán diferentes estructuras químicas de manera que se inducen respuestas inmunes específicas para los diferentes antígenos. Los linfocitos específicos de antígeno pueden participar en la respuesta inmune y, en el caso de la participación de los linfocitos B, los anticuerpos específicos de antígeno pueden formar parte de la respuesta inmune. Las formulaciones descritas anteriormente pueden incluir excipientes, estabilizadores, desecantes, conservantes, adhesivos y materiales del parche conocidos en la técnica.

En otra realización de la invención, la invención se usa para tratar un sujeto. Si el antígeno se obtiene de un patógeno, el tratamiento vacuna al sujeto frente a la infección por el patógeno o frente a sus efectos patógenos tales como los causados por la secreción de toxinas. Una formulación que incluye un antígeno tumoral puede proporcionar un tratamiento para el cáncer; una formulación que incluye un autoantígeno puede proporcionar un tratamiento para una enfermedad causada por el sistema inmune del propio sujeto (por ejemplo, enfermedad autoinmune). La invención puede usarse terapéuticamente para tratar una enfermedad existente, como protección para prevenir una enfermedad, para reducir la gravedad y/o duración de una enfermedad o para mejorar los síntomas de una enfermedad.

En una realización adicional de la invención, se proporciona un parche para usarse en los métodos anteriores. El parche puede comprender un apósito y cantidades eficaces de antígeno y de adyuvante. El apósito puede ser oclusivo o no oclusivo.

Un parche que contiene adyuvante y antígeno puede contener un único reservorio o múltiples reservorios con componentes individuales de la formulación. El parche puede incluir antígenos adicionales de manera que la aplicación del parche induce una respuesta inmune frente a múltiples antígenos. En dicho caso, los antígenos pueden obtenerse o no de la misma fuente, pero los antígenos tendrán diferentes estructuras químicas de manera que inducen una respuesta inmune específica para los diferentes antígenos. Pueden aplicarse múltiples parches simultáneamente; un único parche puede contener múltiples reservorios. Para el tratamiento eficaz, pueden aplicarse múltiples parches en intervalos frecuentes o constantemente durante un periodo de tiempo (véase la Pat. U.S. No. 5.049.387 y los Ejemplos para una descripción detallada de un parche); o pueden aplicarse simultáneamente.

La formulación en forma líquida o sólida puede aplicarse de una manera similar usando múltiples antígenos y adyuvantes ambos en el mismo sitio o sitios separados o simultáneamente o en aplicaciones frecuentes, reiteradas. El parche puede incluir un reservorio controlado, de liberación o puede usarse una matriz o una membrana que controla la velocidad que permite la liberación escalonada del antígeno. El parche puede contener un único reservorio con antígeno o adyuvante o múltiples reservorios para separar los antígenos y adyuvantes individuales.

Pero al menos un antígeno o adyuvante debe mantenerse en forma seca antes de la administración. La liberación posterior del líquido desde un reservorio o la entrada del líquido en un reservorio que contiene el ingrediente seco de la formulación disolverá al menos parcialmente ese ingrediente.

El sitio de la aplicación puede protegerse con corticosteroides anti-inflamatorios tales como hidrocortisona, triamcinolona y mometazona o fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID) para reducir la posible reacción local de la piel o para modular el tipo de respuesta inmune. De manera similar, los esteroides anti-inflamatorios o NSAID pueden incluirse en el material del parche, en cremas, pomadas, etc. y los corticosteroides o NSAID pueden aplicarse después de la inmunización. Pueden usarse IL-10, TNF-α, otros inmunomoduladores en lugar de los agentes anti-inflamatorios. Además, en otra realización más de la invención, la formulación se aplica en la piel intacta cubriendo más de un campo de ganglios linfáticos de drenaje usando aplicaciones únicas o múltiples. La formulación puede incluir antígenos adicionales de manera que la aplicación en la piel intacta induce una respuesta inmune frente a múltiples antígenos. En dicho caso, los antígenos pueden obtenerse o no de la misma fuente, pero los antígenos tendrán diferentes estructuras químicas de manera que inducen una respuesta inmune específica para los diferentes antígenos. Los parches con múltiples cámaras podrían permitir una administración más eficaz de vacunas multivalentes porque cada cámara cubre un conjunto individual de células presentadoras de antígeno. Así, las células presentadoras de antígeno se encontrarán sólo con un antígeno (más adyuvante) y se eliminaría así la competición antigénica y de esta manera se incrementaría la respuesta a cada antígeno individual en la vacuna multivalente.

La formulación puede aplicarse en la piel intacta para reforzar o cebar la respuesta inmune conjuntamente con la penetración física u otras rutas de inmunización. Así, el cebado con la inmunización transcutánea con aplicaciones únicas o múltiples puede seguirse de técnicas orales, nasales o parenterales para reforzar la inmunización con el mismo antígeno o con antígenos alterados. La formulación puede incluir antígenos adicionales de manera que la aplicación en la piel intacta induce una respuesta inmune frente a múltiples antígenos.

Además del antígeno y del adyuvante, La formulación puede comprender un vehículo. Por ejemplo, la formulación puede comprender AQUAPHOR (una emulsión de petrolato, aceite mineral, cera mineral, cera de lana, pantenol, bisabol y glicerina como se muestra en WO 98/20734), emulsiones (por ejemplo, cremas acuosas), microemulsiones, geles, emulsiones aceite en agua (por ejemplo, cremas grasas), lípidos anhidros y emulsiones aceite en agua, otros tipos de emulsiones, grasas, ceras, aceite, siliconas, geles y humectantes (por ejemplo, glicerol). Pero al menos un antígeno o adyuvante se mantiene en forma seca antes de la administración.

El antígeno puede obtenerse de un patógeno que puede infectar al sujeto (por ejemplo, bacteria, virus, hongo o parásito) o de una célula (por ejemplo, una célula tumoral o una célula normal). El antígeno puede ser un antígeno tumoral o un autoantígeno. El antígeno puede ser un alergeno tal como polen, caspa animal, moho, ácaros, alergeno de pulga, alergeno salivar, hierba, alimento (por ejemplo, cacahuetes y otros frutos secos), Bet v 1 (Wiedermann et al., 1998) o incluso un sensibilizador de contacto como níquel o DNCB. El autoantígeno puede estar asociado con una enfermedad autoinmune tal como antígeno de islote (Ramiya et al., 1996). Químicamente, el antígeno puede ser un carbohidrato, glicolípido, glicoproteína, lípido, lipoproteína, fosfolípido, polipéptido o conjugado químico o recombinante de los anteriores, El peso molecular del antígeno puede ser mayor de 500 daltons, preferiblemente mayor de 800 daltons y más preferiblemente mayor de 1.000 daltons.

El antígeno puede obtenerse por técnicas recombinantes, síntesis química o purificación a partir de una fuente natural. El antígeno puede ser proteínico o un conjugado con polisacárido. El antígeno puede proporcionarse como un virus vivo, virus vivo atenuado o virus que ha sido inactivado por técnicas químicas o genéticas. Alternativamente, el antígeno puede estar al menos parcialmente purificado en forma sin células (por ejemplo, fracción de membrana, lisado celular completo).

La inclusión de un adyuvante puede permitir la potenciación o modulación de la respuesta inmune. Además, la selección de un antígeno o adyuvante adecuado puede permitir la inducción preferente de una respuesta inmune humoral o celular, isotipos de anticuerpo específicos (por ejemplo, IgM, IgD, IgA1, IgA2, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4) y/o subconjuntos específicos de células T (por ejemplo, CTL, Th1, Th2 y/o T_{DTH}). Preferiblemente, el adyuvante es una exotoxina que ADP-ribosila activada o una subunidad de ésta.

El término "antígeno" tal y como se usa en la invención, se pretende que describa una sustancia que induce una respuesta inmune específica cuando se presenta a las células inmunes de un sujeto. Un antígeno puede comprender una único epítopo inmunogénico o una multiplicidad de epítopos inmunogénicos reconocidos por un receptor de las células B (es decir, anticuerpo en la membrana de la célula B) o un receptor de las células T. Una molécula puede ser tanto un antígeno como un adyuvante (por ejemplo, la toxina del cólera) y, así, la formulación puede contener sólo un ingrediente o componente.

El término "adyuvante" tal y como se usa en la invención, se pretende que describa una sustancia añadida a la formulación para ayudar en la inducción de una respuesta inmune frente al antígeno.

El término "cantidad eficaz" tal y como se usa en la invención, se pretende que describa aquella cantidad de antígeno que induce una respuesta inmune específica de antígeno.

Dicha inducción de una respuesta inmune puede proporcionar un tratamiento tal como, por ejemplo, inmunoprotección, desensibilización, inmunosupresión, modulación de una enfermedad autoinmune, potenciación del inmunoseguimiento del cáncer o vacunación terapéutica frente a una enfermedad infecciosa establecida. Un

producto o método "induce" cuando su presencia o ausencia causa un incremento o disminución, respectivamente, estadísticamente significativo en la magnitud y/o cinética de la respuesta inmune; cambio en los elementos inducidos del sistema inmune (por ejemplo, humoral frente a celular, Th1 frente a Th2); efecto en la salud y bienestar del sujeto; o combinaciones de éstos.

El término "campo de ganglios linfáticos de drenaje" tal y como se usa en la invención significa un área anatómica sobre la que la linfa recogida se filtra a través de un conjunto de ganglios linfáticos definidos (por ejemplo, cervical, axilar, inguinal, epitroclear, popliteal, aquellos del abdomen y del tórax).

Sin estar ligado a ninguna teoría particular sino únicamente para proporcionar una explicación para nuestras observaciones, se presume que el sistema de administración de inmunización transcutánea porta el antígeno a las células del sistema inmune donde se induce una respuesta inmune. El antígeno puede pasar a través de las capas protectoras exteriores normales de la piel (es decir, el estrato córneo) e inducir la respuesta inmune directamente o a través de una población de células presentadoras de antígeno en la epidermis (por ejemplo, macrófago, macrófago tisular, célula de Langerhans, célula dendrítica, célula dendrítica dérmica, linfocito B o célula de Kupffer) que presenta el antígeno procesado a un linfocito. Opcionalmente, el antígeno puede pasar a través del estrato córneo a través de un folículo piloso o un orgánulo de la piel (por ejemplo, glándula sudorípara, glándula sebácea).

Por ejemplo, la inmunización transcutánea con exotoxinas bacterianas que ADP-ribosilan (bARE) como un ejemplo, puede tener como diana la célula de Langerhans epidérmica, que se sabe que está entre las células presentadoras de antígeno (APC) más eficaces. Hemos encontrado que bARE activan las células de Langerhans cuando se aplican epicutáneamente en la piel intacta. Los adyuvantes tales como una LT escindida con tripsina pueden incrementar la activación de la célula de Langerhans. Las células de Langerhans dirigen respuestas inmunes específicas mediante la fagocitosis de los antígenos y la migración a los ganglios linfáticos donde actúan como APC para presentar el antígeno a los linfocitos e inducen de esta manera una respuesta potente de anticuerpo. Aunque la piel se considera generalmente una barrera para los organismos invasores, la imperfección de esta barrera se demuestra por las numerosas células de Langerhans distribuidas en toda la epidermis que están diseñadas para orquestar la respuesta inmune frente a los organismos que invaden a través de la piel. Según Udey (1997):

"Las células de Langerhans son células derivadas de la médula ósea que están presentes en todos los epitelios escamosos estratificados de los mamíferos. Comprenden toda la actividad celular auxiliar que está presente en la epidermis no inflamada y en el paradigma actual son esenciales para el inicio y la propagación de las respuestas inmunes dirigidas frente a antígenos aplicados epicutáneamente. Las células de Langerhans son miembros de una familia de células auxiliares potentes ("células dendríticas") que están distribuidas ampliamente, pero representadas con poca frecuencia, en los epitelios y órganos sólidos así como en el tejido linfoide.

"Ahora se reconoce que las células de Langerhans (y presumiblemente otras células dendríticas) tienen un ciclo de vida con al menos dos etapas distintas. Las células de Langerhans que están localizadas en la epidermis constituyen una red regular de células "centinela" que atrapan antígenos. Las células de Langerhans epidérmicas pueden ingerir material particulado, incluyendo microorganismos, y son procesadores eficaces de antígenos complejos. Sin embargo, sólo expresan bajos niveles de antígenos MHC clase I y II y moléculas coestimuladoras (ICAM-1, B7-1 y B7-2) y son estimuladores débiles de las células T no cebadas. Después del contacto con el antígeno, algunas células de Langerhans se activan, salen de la epidermis y migran a regiones dependientes de células T de los ganglios linfáticos regionales donde se localizan como células dendríticas maduras. En el curso de la salida de la epidermis y la migración a los ganglios linfáticos, las células de Langerhans epidérmicas que portan antígeno (ahora los "mensajeros") presentan cambios dramáticos en morfología, fenotipo superficial y función. En contraste con las células de Langerhans epidérmicas, las células dendríticas linfoides son esencialmente no fagocíticas y procesan los antígenos proteicos poco ineficazmente, pero expresan altos niveles de antígenos MHC clase I y II y varias moléculas coestimuladoras y son los estimuladores más potentes de células T sin estimular que se han identificado."

Prevemos que la potente capacidad de presentación de antígeno de las células de Langerhans epidérmicas puede aprovecharse para las vacunas administradas transcutáneamente. Una respuesta inmune transcutánea usando el sistema inmune de la piel puede conseguirse administrando la formulación sólo a las células de Langerhans del estrato córneo (es decir, la capa más exterior de la piel que consiste en células cornificadas y lípidos), por ejemplo, por la difusión pasiva y activación posterior de las células de Langerhans para captar el antígeno, migrar a folículos de células B y/o regiones dependientes de células T y presentar el antígeno a las células B y/o T. Si las células de Langerhans van a fagocitar antígenos distintos de bARE (por ejemplo, BSA), estos antígenos también podrían ser captados por el ganglio linfático para la presentación a las células T y posteriormente inducir una respuesta inmune específica para ese antígeno (por ejemplo, BSA). Así, una característica de la inmunización transcutánea es la activación de la célula de Langerhans, presumiblemente por una bARE, o por LT activada por tripsina u otras exotoxinas bacterianas que ADP-ribosilan activadas, subunidades de unión de exotoxinas que ADP-ribosilan (por ejemplo, subunidad B de la toxina del cólera), proteínas de fusión recombinantes, citoquinas tales como TNFα, IL-1β, fragmentos peptídicos activos de IL1β, LPS, derivados y análogos de LPS, lípido A u otra sustancia que active la célula de Langerhans incluyendo sensibilizadores de contacto o adyuvantes. Sería de esperar que el incremento del tamaño de la población de células de Langerhans de la piel o su estado de activación mediante el lavado o

tratamiento con acetona incremente la respuesta inmune. En la piel madura o sin LC (es decir, por daño con UV) puede ser posible usar tretinoína para reponer la población de células de Langerhans (Murphy et al., 1998).

Debe observarse que se sabe que los adyuvantes tales como LPS son altamente tóxicos cuando se inyectan o se proporcionan sistémicamente (Rietschel et al., 1994; Vosika et al., 1984) pero si se ponen en la superficie de la piel intacta es improbable que induzcan una toxicidad sistémica y así la ruta transcutánea puede permitir la ventaja de efectos adyuvantes sin toxicidad sistémica, de manera similar a nuestros descubrimientos con CT. Una ausencia similar de toxicidad podría esperarse si la piel se penetrara sólo por debajo del estrato córneo. Así, la capacidad para inducir la activación del sistema inmune a través de la piel confiere la ventaja inesperada de respuestas inmunes potentes sin toxicidad sistémica.

Además, la magnitud de la respuesta de anticuerpo inducida por la inmunización transcutánea y el cambio de isotipo predominantemente a IgG se consigue generalmente con ayuda de las células T (Janeway y Travers, 1996) y se sugiere la activación tanto de la ruta Th1 como Th2 por la producción de IgG1 e IgG2a (Paul y Seder, 1994; Seder y Paul, 1994). Alternativamente, puede inducirse una gran respuesta de anticuerpo por un antígeno tipo 1 independiente del timo (TI-1) que activa directamente la célula B (Janeway y Travers, 1996) o podría tener efectos activadores similares en las células B tales como la regulación al alza de MHC Clase II, B7, CD40, CD25 e ICAM-1 (Nashar et al., 1997).

El espectro de las respuestas inmunes de la piel más comúnmente conocidas está representado por la dermatitis de contacto y la atopía. La dermatitis de contacto, una manifestación patógena de la activación de LC, está dirigida por las células de Langerhans que fagocitan el antígeno, migran a los ganglios linfáticos, presentan el antígeno y sensibilizan a las células T que migran a la piel y causan la respuesta celular destructora intensa que ocurre en los sitios afectados de la piel (Dahl, 1996; Leung, 1997). Se sabe que generalmente dichas respuestas no están asociadas con anticuerpos IgG específicos de antígeno. La dermatitis atópica puede utilizar la célula de Langerhans de una manera similar pero se identifica con células Th2 y está asociada generalmente con altos niveles de anticuerpo IgE (Dahl, 1996; Leung, 1997).

La inmunización transcutánea con la toxina del cólera y bARE relacionadas, por otra parte, es una respuesta inmune nueva con ausencia de descubrimientos típicos de atopía o dermatitis de contacto dados los altos niveles de IgG que se inducen. Por ejemplo, la aplicación de la toxina del cólera epicutáneamente en la piel intacta consigue la inmunización en ausencia de la infiltración de linfocitos a las 24, 48 y 120 horas después de la inmunización. Esto indica que las células de Langerhans están involucradas en la inmunización transcutánea ya que "comprenden toda la actividad celular auxiliar que está presente en la epidermis no inflamada y en el paradigma actual son esenciales para el inicio y la propagación de las respuestas inmunes dirigidas frente a antígenos aplicados epicutáneamente" (Udey, 1997). La singularidad de la respuesta inmune transcutánea aquí también se indica por los altos niveles de anticuerpo IgG específico de antígeno y por el tipo de anticuerpo producido (por ejemplo, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA) y generalmente por la ausencia de anticuerpo IgE específico de antígeno. La inmunización transcutánea podría ocurrir posiblemente en tándem con la inflamación de la piel si se produjera una activación suficiente de las APC y de las células T en una respuesta transcutánea que coexistiera con atopía o dermatitis de contacto.

El direccionamiento transcutáneo de las células de Langerhans también puede usarse en tándem como agentes para desactivar toda o parte de su función de presentación de antígeno, modificando de esta manera la inmunización o evitando la sensibilización. Las técnicas para modular la activación de las células Langerhans u otras células inmunes de la piel, por ejemplo, el uso de agentes anti-inflamatorios esteroideos o no esteroideos (NSAID), ciclofosfamida u otros inmunosupresores, interleuquina-10, anticuerpo monoclonal frente a interleuquina-1, inhibidores de la enzima conversora de interleuquina-1 (ICE), antagonista del receptor de interleuquina-1 (RA) o depleción mediante superantígenos tales como enterotoxina A de staphylococcos (SEA) indujeron la depleción de las células de Langerhans epidérmicas. Pueden usarse compuestos similares para modificar la respuesta innata de las células de Langerhans e inducir diferentes respuestas de T colaboradoras (Th1 o Th2) o pueden modular las respuestas inflamatorias de la piel para disminuir los efectos secundarios potenciales de la inmunización.

De manera similar, los linfocitos pueden inmunosuprimirse antes, durante o después de la inmunización por la administración de un inmunosupresor separadamente o por la co-administración de un inmunosupresor con la formulación. Por ejemplo, puede ser posible inducir una potente respuesta inmune protectora sistémica con agentes que normalmente resultarían en hipersensibilidad de contacto alérgica o irritante pero la adición de inhibidores de ICE puede paliar las reacciones adversas de la piel (Zepter et al., 1997).

La inmunización transcutánea puede inducirse mediante la actividad de unión al ganglíosido GM1 de CT, LT o subunidades tales como CTB. El ganglíosido GM1 es un glicolípido de membrana celular ubicuo que se encuentra en todas las células de mamífero. Cuando la subunidad pentamérica B de CT se une a la superficie celular, se forma un poro hidrofílico que permite a la subunidad A insertarse a través de la bicapa lipídica (Ribi et al., 1988). Pueden utilizarse otras dianas de unión en las APC. La subunidad B de LT se une al ganglíosido GM1 además de a otros ganglíosidos y sus actividades de unión pueden ser las responsables del hecho de que LT sea altamente inmunogénica en la piel.

La inmunización transcutánea con CT o CTB puede requerir la actividad de unión al ganglióside GM1. Cuando se inmunizan transcutáneamente ratones con CT, CTA y CTB, sólo CT y CTB resultaron en una respuesta inmune. CTA contiene la actividad de ADP-ribosilación de la exotoxina pero sólo CT y CTB que contienen la actividad de unión son capaces de inducir una respuesta inmune lo que indica que la subunidad B era necesaria y suficiente para inmunizar a través de la piel. Concluimos que las células de Langerhans u otras APC pueden activarse por la unión de CTB a su superficie celular lo que resulta en una respuesta inmune transcutánea.

ANTÍGENO

Un sistema de inmunización transcutánea administra agentes a células especializadas (por ejemplo, célula de presentación de antígeno, linfocito) que producen una respuesta inmune. Estos agentes como clase se denominan antígenos. El antígeno puede estar compuesto por compuestos químicos tales como, por ejemplo, carbohidrato, glicolípido, glicoproteína, lípido, lipoproteína, fosfolípido, polipéptido, conjugados de éstos, u otro material cualquiera que se sabe que induce una respuesta inmune. El antígeno puede proporcionarse como un organismo completo tal como, por ejemplo, una bacteria o virión; el antígeno puede obtenerse de un extracto o lisado, bien de células completas o sólo de membrana; o el antígeno puede sintetizarse químicamente o producirse por medios recombinantes.

El antígeno de la invención puede expresarse por medios recombinantes, preferiblemente como una fusión con una etiqueta de afinidad o epítopo (Summers y Smith, 1987; Goeddel, 1990; Ausubel et al., 1996); puede usarse síntesis química de un oligopéptido, bien libre o conjugado con proteínas transportadoras, para obtener el antígeno de la invención (Bodanszky, 1993; Wisdom, 1994). Los oligopéptidos se consideran un tipo de polipéptidos. Se prefieren las longitudes de oligopéptido de 6 residuos a 20 residuos. Los polipéptidos también pueden sintetizarse como estructuras ramificadas tales como las descritas en las Pat. U.S. Nos. 5.229.490 y 5.390.111. Los polipéptidos antigénicos incluyen, por ejemplo, epítopos de célula B o célula T sintéticos o recombinantes, epítopos de célula T universales y epítopos de célula T mixtos de un organismo o enfermedad y epítopos de célula B de otro. El antígeno obtenido mediante medios recombinantes o síntesis peptídica, así como el antígeno de la invención obtenido a partir de fuentes o extractos naturales, puede purificarse por las características físicas y químicas del antígeno, preferiblemente por fraccionamiento o cromatografía (Janson y Ryden, 1997; Deutscher, 1990, Scopes, 1993). Los recombinantes pueden combinar subunidades B o quimeras de bARE (Lu et al., 1997). Una formulación de antígeno multivalente puede usarse para inducir una respuesta inmune frente a más de un antígeno al mismo tiempo. Los conjugados pueden usarse para inducir una respuesta inmune frente a múltiples antígenos, para reforzar la respuesta inmune, o ambos. Además, las toxinas pueden reforzarse por el uso de toxoides o los toxoides reforzarse por el uso de toxinas. La inmunización transcutánea puede usarse para reforzar respuestas inducidas inicialmente por otras rutas de inmunización tales como por las rutas oral, nasal o parenteral. El antígeno incluye, por ejemplo, toxinas, toxoides, subunidades de éstos o combinaciones de éstos (por ejemplo, toxina del cólera, toxoide tetánico); además las toxinas, toxoides, subunidades de éstos o combinaciones de éstos pueden actuar como antígeno y como adyuvante. Dicha inmunización oral/transcutánea o transcutánea/oral puede ser especialmente importante para incrementar la inmunidad mucosal en enfermedades en las que la inmunidad mucosal se correlaciona con protección.

El antígeno puede solubilizarse en un tampón o en agua o en disolventes orgánicos tales como alcohol o DMSO, o incorporarse en geles, emulsiones, microemulsiones y cremas. Los tampones adecuados incluyen, pero no están limitados a, disolución salina tamponada con fosfato sin Ca^{++}/Mg^{++} (PBS), disolución salina tamponada con fosfato (PBS), disolución salina normal (150 mM NaCl en agua) y tampón Tris. El antígeno que no es soluble en un tampón neutro puede solubilizarse en 10 mM ácido acético y diluirse hasta el volumen deseado con un tampón neutro tal como PBS. En el caso de un antígeno soluble sólo a pH ácido, puede usarse acetato-PBS a pH ácido como diluyente después de la solubilización en ácido acético diluido. El glicerol puede ser un tampón no acuoso adecuado para usarse en la invención.

Un antígeno hidrofóbico puede solubilizarse en un detergente, por ejemplo, un polipéptido que contiene un dominio transmembrana. Además, para las formulaciones que contienen liposomas, un antígeno en una disolución de detergente (por ejemplo, un extracto de membrana celular) puede mezclarse con lípidos y los liposomas pueden formarse por la eliminación del detergente por dilución, diálisis o cromatografía en columna, véase, Gregoriadis (1995). Determinados antígenos tales como, por ejemplo, aquellos de un virus (por ejemplo hepatitis A) no necesitan ser solubles per se, sino que pueden incorporarse directamente en una membrana lipídica (por ejemplo, un virosoma como describen Morein y Simons, 1985), en una suspensión de virión solo o suspensiones de microesferas o bacterias inactivadas con calor que pueden ser captadas por las células presentadoras de antígeno activadas (por ejemplo, opsonización). Los antígenos también pueden mezclarse con un potenciador de la penetración como se describe en WO 99/43350.

Plotkin y Mortimer (1994) proporcionan antígenos que pueden usarse para vacunar animales o seres humanos para inducir una respuesta inmune específica para patógenos particulares, así como métodos para preparar el antígeno, determinar una dosis adecuada de antígeno, ensayar para la inducción de una respuesta inmune y tratar la infección por un patógeno (por ejemplo, bacteria, virus, hongo o parásito).

Las bacterias incluyen, por ejemplo: antrax, campylobacter, cólera, clostridia incluyendo clostridium difficile, difteria, E: coli enterohemorrágica, E. coli enterotoxigénica, giardia, gonococcus, Helicobacter pylori o ureasa producida por H. pylori (Lee y Chen, 1994), Hemophilus influenza B, Hemophilus influenza no tipificable, Legionella, meningococcus, mycobacterium incluyendo aquellos organismos responsables de la tuberculosis, pertussis, pneumococcus, salmonella, shigella, staphylococcus y sus enterotoxinas, streptococcus beta hemolíticos grupo A, Streptococcus B, tétanos, Vibrio cholerae, Borrelia burgdorfi y Yersinia; y productos de éstos.

Los virus incluyen, por ejemplo: adenovirus, dengue serotipos 1 a 4 (Delenda et al., 1994; Fonseca et al., 1994; Smucny et al., 1995), ébola (Jahrling et al., 1996), enterovirus, virus hanta, hepatitis serotipos A a E (Blum, 1995; Katkov, 1996; Lieberman y Greenberg, 1996; Mast, 1996; Shafara et al., 1995; Smedila et al., 1994; Pat. U.S. Nos. 5.314.808 y 5.436.126), virus del herpes simple 1 ó 2, virus de la inmunodeficiencia humana (Deprez et al., 1996), virus del papiloma humano, influenza, sarampión, Norwalk, encefalitis equina japonesa, virus del papiloma, parvovirus B19, polio, rabia, virus respiratorio sincitial**,** rotavirus, rubéola, sarampión, encefalitis de St. Louis, vaccinia, vectores de expresión virales que contienen genes que codifican otros antígenos tales como los antígenos de la malaria, varicela y fiebre amarilla; y productos de éstos.

Los parásitos incluyen, por ejemplo: Entamoeba histolytica (Zhang et al., 1995); Plasmodium (Bathurst et al., 1993; Chang et al., 1989, 1992, 1994; Fries et al., 1992a, 1992b; Herrington et al., 1991; Khusmith et al., 1991; Malik et al., 1991; Migliorini et al., 1993; Pessi et al., 1991; Tam, 1988; Vreden et al., 1991; White et al., 1993; Wiesmueller et al., 1991), Leishmania (Frankenburg et al., 1996) y los Helmintos; Schistosomas; y productos de éstos.

Los hongos incluyen entidades responsables de tiña corporal, tiña ungueal, esporotricosis, aspergillosis, cándida y otros hongos patógenos.

ADYUVANTE

La formulación también contiene un adyuvante, aunque una única molécula puede contener tanto propiedades adyuvantes como antigénicas (por ejemplo, la toxina del cólera) (Elson y Dertzbaugh, 1994). Los adyuvantes son sustancias que se usan para potenciar específicamente o no específicamente una respuesta inmune específica de antígeno. Habitualmente, el adyuvante y la formulación se mezclan antes de la presentación del antígeno pero, alternativamente, pueden presentarse separadamente en un corto intervalo de tiempo.

El adyuvante en la formulación de la invención comprende una exotoxina bacteriana que ADP-ribosila o una subunidad de ésta, que engloba exotoxinas bacterianas mutantes que ADP-ribosilan que se unen al gangliósido GM1 incluyendo mutantes en el sitio de escisión de la tripsina (Dickenson y Clements, 1995) y que afectan a la ADP-ribosilación (Douce et al., 1997). Otros adyuvantes incluyen, por ejemplo, una emulsión en aceite (por ejemplo, adyuvante de Freund completo o incompleto), una quimioquina (por ejemplo, defensinas 1 ó 2, RANTES, MIP1-α, MIP-2, interleuquina-8 o una citoquina (por ejemplo, interleuquina-1β, -2, -6, -10 o -12; interferón gamma; factor de necrosis tumoral α; o factor de estimulación de las colonias de granulocitos-macrófagos (revisado en Nohria y Rubin, 1994), un derivado de muramil péptido (por ejemplo, murabutido, treonil-MDP o muramil tripéptido), una proteína de choque térmico o un derivado, un derivado de LeIF de Leishmania major (Skeiky et al., 1995), un derivado de lipopolisacárido (LPS) (por ejemplo, lípido A o monofosforil lípido A o análogos del lípido A), superantígeno (Saloga et al., 1996b), QS21, Quill A o alum. También, véase Richards et al. (1995) para otros adyuvantes útiles en la inmunización.

Un adyuvante puede elegirse para inducir preferentemente anticuerpos o efectores celulares, isotipos específicos de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgD, IgA1, IgA2, IgA de secreción, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4) o subconjuntos específicos de células T (por ejemplo, CTL, Th1, Th2 y/o T_{DTH}) (véase, por ejemplo, Munoz et al., 1990, Glenn et al., 1995).

Se sabe que los dinucleótidos o restos CpG no metilados activan las células B y los macrófagos (Kreig et al., 1995; Stacey et al., 1996). Otras formas de ADN bacteriano pueden usarse como adyuvantes. Los ADN bacterianos están en una clase de estructuras que tienen patrones que permiten al sistema inmune reconocer sus orígenes patógenos para estimular la respuesta inmune innata que da lugar a las respuestas inmunes adaptativas (Medzhitov y Janeway, 1997). Estas estructuras se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) e incluyen lipopolisacáridos, ácidos teicoicos, restos CpG no metilados, ARN bicatenario y maninas. Los PAMP inducen señales endógenas que pueden mediar la respuesta inflamatoria, actuar como co-estimuladores de la función de la célula T y controlar la función efectora. La capacidad de los PAMP para inducir estas respuestas juega un papel en su potencial como adyuvantes y sus dianas son APC tales como macrófagos y células dendríticas. Las células presentadoras de antígeno de la piel podrían estimularse asimismo con PAMP transmitidos a través de la piel. Por ejemplo, las células de Langerhans, un tipo de célula dendrítica, podrían activarse por un PAMP en disolución en la piel con una molécula débilmente inmunogénica transcutáneamente y ser inducidos a migrar y a presentar esta molécula débilmente inmunogénica a las células T en el ganglio linfático, induciendo una respuesta de anticuerpo frente a la molécula débilmente inmunogénica. Los PAMP también podrían usarse conjuntamente con otros adyuvantes de la piel tales como la toxina del cólera para inducir diferentes moléculas co-estimuladoras y controlar diferentes funciones efectoras para guiar la respuesta inmune, por ejemplo de una respuesta Th2 a una Th1.

La toxina del cólera es una exotoxina bacteriana de la familia de las exotoxinas que ADP-ribosilan (referidas como bARE). La mayoría de las bARE se organizan como dímero A:B con una subunidad de unión B y una subunidad A que contiene la ADP-ribosiltransferasa. Dichas toxinas incluyen difteria, exotoxina A de Pseudomonas, toxina del cólera (CT), enterotoxina sensible al calor de E. coli (LT), toxina pertussis, toxina C2 de C. botulinum, toxina C3 de C. botulinum, exoenzima de C. limosum, exoenzima de B. cereus, exotoxina S de Pseudomonas, EDIN de Staphylococcus aureus y toxina de B. sphaericus.

La toxina del cólera es un ejemplo de una bARE que está organizada con subunidades A y B. La subunidad B es la subunidad de unión y está unida no covalentemente a la subunidad A. El pentámero de la subunidad B está organizado en una estructura simétrica en forma de rosquilla que se une al ganglíosido GM1 en la célula diana. La subunidad A sirve para ADP-ribosilar la subunidad alfa de un subconjunto de proteínas GTP heterotriméricas (proteínas G) incluyendo la proteína Gs lo que resulta en los niveles intracelulares de AMP cíclico elevados. Esto estimula la liberación de iones y de fluido desde las células intestinales en el caso del cólera. Sin embargo, la toxina del cólera (CT) y su subunidad B (CTB) tienen propiedades adyuvantes cuando se usan como un inmunógeno intramuscular u oral (Elson y Dertzbaugh, 1994; Trach et al., 1997). La enterotoxina sensible al calor de E. coli (LT) es 75-77% homóloga a nivel de aminoácidos con CT y posee propiedades de unión similares; también parece que se une al receptor del ganglíosido GM1 en el intestino y tiene actividades de exotoxina ADP-ribosilantes similares. La exotoxina A de Pseudomonas (ETA) se une al receptor de macroglobulina α2 de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Kounnas et al., 1992). Las bARE las han revisado Krueger y Barbieri (1995). CT, CTB, LT, ETA y PT, a pesar de tener diferentes sitios de unión celular, son adyuvantes potentes para la inmunización transcutánea, induciendo anticuerpos IgG pero no anticuerpos IgE. CTB sin CT también puede inducir anticuerpos IgG. Así, las dos bARE y un derivado de éstas pueden inmunizar eficazmente cuando se aplican epicutáneamente en la piel en una única disolución.

Cuando un adyuvante tal como CT se mezcla con BSA, una proteína que no es habitualmente inmunogénica cuando se aplica en la piel, se inducen anticuerpos anti-BSA. Una respuesta inmune frente al toxoide de la difteria se indujo usando toxina pertussis como adyuvante, pero no con el toxoide de la difteria solo. LT nativa como un adyuvante y antígeno, sin embargo, claramente no es tan potente como CT nativa. Pero las bARE activadas pueden actuar como adyuvantes para proteínas no inmunogénicas en un sistema de inmunización transcutánea. Así, la inmunización terapéutica con un antígeno para el organismo tal como VIH, HPV o leishmania podría usarse separadamente o conjuntamente con la inmunoestimulación de APC infectadas para inducir una inmunización terapéutica.

La protección frente a las infecciones potencialmente mortales difteria, pertussis y tétanos (DPT) puede conseguirse induciendo altos niveles de anticuerpos anti-toxina circulantes. Pertussis puede ser una excepción ya que algunos investigadores piensan que los anticuerpos dirigidos frente a otras partes del organismo invasor son necesarios para la protección, aunque esto es controvertido (véase Schneerson et al., 1996) y la mayoría de las vacunas pertussis acelulares de nueva generación tienen PT o PT genéticamente destoxificada como un componente de la vacuna (Krueger y Barbieri, 1995). Las patologías en las enfermedades causadas por DPT están relacionadas directamente con los efectos de sus toxinas y con toda seguridad los anticuerpos anti-toxina juegan un papel en la protección (Schneerson et al., 1996).

En general, las toxinas pueden inactivarse químicamente para formar toxoides que son menos tóxicos pero siguen siendo inmunogénicos. Prevemos que el sistema de inmunización transcutánea usando inmunógenos y adyuvantes basados en toxinas puede conseguir niveles de anti-toxina adecuados para la protección frente a estas enfermedades. Los anticuerpos anti-toxina pueden inducirse mediante la inmunización con las toxinas, o los toxoides genéticamente destoxificados en sí mismos, o con toxoides y adyuvantes tales como CT. Se prevé que las toxinas convertidas genéticamente en toxoides que tienen una actividad exotoxina de ADP-ribosilación o sitio de escisión de tripsina alterados, pero no la actividad de unión, son especialmente útiles como activadores no tóxicos de las células presentadoras de antígeno usadas en la inmunización transcutánea y pueden reducir los problemas acerca del uso de toxinas.

CT también puede actuar como un adyuvante para inducir CTL específicas de antígeno mediante la inmunización transcutánea. El adyuvante bARE puede conjugarse químicamente con otros antígenos incluyendo, por ejemplo, antígenos de carbohidratos, polipéptidos, glicolípidos y glicoproteína. Podría esperarse que la conjugación química con toxinas, sus subunidades o toxoides con estos antígenos incrementaría la respuesta inmune frente a estos antígenos cuando se aplica epicutáneamente. Para solucionar el problema de la toxicidad de las toxinas (por ejemplo, se sabe que la toxina de la difteria es tan tóxica que una molécula puede matar una célula) y para solucionar la dificultad de trabajar con toxinas tan potentes como la tetánica, varios investigadores han adoptado una estrategia recombinante para producir toxoides producidos genéticamente. Esto se basa en inactivar la actividad catalítica de la ADP ribosil transferasa por deleción genética. Estas toxinas retienen las capacidades de unión, pero carecen de la toxicidad de las toxinas naturales. Esta estrategia la describen Burnette et al. (1994), Rappuoli et al. (1995) y Rappuoli et al. (1996). Sería de esperar que dichas exotoxinas convertidas genéticamente en toxoides indujeran una respuesta inmune transcutánea y que actuaran como adyuvantes (Douce et al., 1997). Pueden proporcionar una ventaja en un sistema de inmunización transcutánea ya que no crearían un problema de seguridad porque los toxoides no se considerarían tóxicos. La activación mediante una técnica tal como la escisión con tripsina, sin embargo, se esperaría que incrementara las calidades de adyuvante de LT a través de la piel que carece de enzimas de tripsina inherentes. Además, existen varias técnicas para convertir químicamente a las toxinas

en toxoides que pueden abordar el mismo problema (Schneerson et al., 1996). Estas técnicas podrían ser importantes para determinadas aplicaciones, especialmente aplicaciones pediátricas, en las que las toxinas ingeridas (por ejemplo, la toxina de la difteria) podrían crear, posiblemente, reacciones adversas.

Opcionalmente, un activador de las células de Langerhans puede estar presente en la formulación. Los ejemplos de dichos activadores incluyen: un inductor de la proteína de choque térmico; sensibilizador de contacto (por ejemplo, trinitroclorobenceno, dinitrofluorobenceno, mostaza de nitrógeno, pentadecilcatecol); toxina (por ejemplo, toxina Shiga, enterotoxina B de Staph); lipopolisacárido, lípido A o derivados de éstos; ADN bacteriano (Stacey et al., 1996); citoquina (por ejemplo, factor de necrosis tumoral α, interleuquina-1β, -10, -12); un miembro de la superfamilia TGFβ, iones calcio en disolución, ionóforo de calcio y una quimioquina (por ejemplo, defensinas 1 ó 2, RANTES, MIP-1α, MIP-2, interleuquina-8).

Además, se consideran las formulaciones que contienen una pequeña cantidad de la toxina del cólera junto con al menos uno de IL-1β, IL-1α, TNF-α, CTB y LPS. La proporción molar de las dos partes de la formulación puede ser entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,20.

Si un antígeno inmunizante tiene las suficientes capacidades de activación de la célula de Langerhans, puede no requerirse un adyuvante separado, como en el caso de CT que es tanto antígeno como adyuvante. Alternativamente, puede considerarse que dichos antígenos no requieren un adyuvante para inducir una respuesta inmune porque son suficientemente inmunogénicos. Se considera que las preparaciones de células completas, virus vivos, virus atenuados, plásmidos de ADN y ADN bacteriano podrían ser suficientes para inmunizar transcutáneamente. También puede ser posible usar bajas concentraciones de sensibilizadores de contacto u otros activadores de las células de Langerhans para inducir una respuesta inmune sin inducir lesiones en la piel.

FORMULACIÓN

Los procesos para fabricar una formulación farmacéutica son muy conocidos. Los componentes de la formulación pueden combinarse con un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable, así como con cualquier combinación de aditivos opcionales (por ejemplo, diluyentes, aglutinantes, excipientes, estabilizadores, desecantes, conservantes, colorantes). El uso de vehículos sólidos, y la adición de excipientes para ayudar en la solubilización de los componentes secos o estabilizadores de la actividad antigénica o adyuvante, son realizaciones preferidas. Véanse, generalmente, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6ª Ed. (edición electrónica, 1998); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 22ª (Gennaro, 1990, Mack Publishing); *Pharmaceutical Dosage Forms*, 2ª Ed. (varios editores, 1989-1998, Marcel Dekker); y *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Ansel et al., 1994, Williams & Wilkins).

Las buenas prácticas de fabricación son conocidas en la industria farmacéutica y están reguladas por organismos gubernamentales (por ejemplo, Food and Drug Administration). Las formulaciones líquidas estériles pueden prepararse disolviendo un componente pretendido de la formulación en una cantidad suficiente de un disolvente apropiado, seguido de esterilización por filtración para eliminar los microbios contaminantes. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diferentes componentes esterilizados de la formulación en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico. Para la producción de formas sólidas que se requiere que sean estériles, puede usarse secado en vacío o liofilización.

En general, las formas de dosificación sólidas (por ejemplo, polvos, gránulos, pastillas, comprimidos) pueden hacerse a partir de al menos un ingrediente o componente activo de la formulación.

Los procedimientos de formación de comprimidos adecuados y la producción de parches son conocidos. La formulación también puede producirse encapsulando las formas sólidas de al menos un ingrediente activo, o manteniéndolas separadas de los líquidos en compartimentos o cámaras. En una realización, el parche puede incluir una bolsa que contiene un vehículo (por ejemplo, una disolución salina) que se rompe por presión y posteriormente solubiliza la formulación seca del parche. El tamaño de cada dosis y el intervalo de la dosificación en el sujeto pueden usarse para determinar un tamaño y forma adecuados del comprimido, cápsula, compartimento o cámara.

Las formulaciones contendrán una cantidad eficaz de los ingredientes activos (por ejemplo, antígeno y adyuvante) junto con un vehículo o cantidades adecuadas de vehículo con el fin de proporcionar composiciones farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración a un ser humano o a un animal. La formulación que incluye un vehículo puede estar en la forma de una crema, emulsión, gel, loción, pomada, pasta, disolución, suspensión u otras formas líquidas conocidas en la técnica; especialmente aquellas que incrementan la hidratación de la piel. Para la invención, sin embargo, se prefiere que al menos un componente activo de la formulación esté en forma sólida.

Las cantidades relativas de los ingredientes activos en una dosis y el esquema de dosificación pueden ajustarse apropiadamente para la administración eficaz a un sujeto (por ejemplo, animal o ser humano). Este ajuste también puede depender de la enfermedad o afección particular del sujeto, y de si se pretende tratamiento o profilaxis. Para simplificar la administración de la formulación al sujeto, cada dosis unitaria contiene los ingredientes activos en cantidades predeterminadas para una única ronda de inmunización.

Hay numerosas causas para la inestabilidad o degradación de los polipéptidos, incluyendo hidrólisis y desnaturalización. En el caso de la desnaturalización, la conformación o estructura tridimensional de la proteína se altera y la proteína se despliega de su estructura globular habitual. En lugar de replegarse a su conformación natural, la interacción hidrofóbica puede causar el agrupamiento de moléculas entre sí (es decir, agregación) o replegamiento a una conformación no natural. Cualquiera de estos resultados puede conllevar la disminución o pérdida de la actividad antigénica o adyuvante. Pueden añadirse estabilizadores para disminuir o evitar dichos problemas.

La formulación, o cualquier intermedio en su producción, puede pretratarse con agentes protectores (es decir, crioprotectores y estabilizadores secos) y someterse a velocidades de enfriamiento y temperaturas finales que minimicen la formación de cristales de hielo. Mediante la selección apropiada de los agentes crioprotectores y el uso de parámetros de secado preseleccionados, casi cualquier formulación podría crioprepararse para un uso final deseado adecuado.

Debe entenderse en la discusión siguiente que se describen aditivos opcionales como excipientes, estabilizadores, desecantes y conservantes por su función. Así, un compuesto químico particular puede actuar como alguna combinación de excipiente, estabilizador, desecante y/o conservante. Dicho compuesto químico sería inmunológicamente inactivo porque no induce directamente una respuesta inmune pero incrementa la respuesta aumentando la actividad inmunológica del antígeno o del adyuvante: por ejemplo, reduciendo la modificación del antígeno o del adyuvante o la desnaturalización durante los ciclos de secado y de disolución.

Los estabilizadores incluyen ciclodextrina y derivados de ésta (véase Pat. U.S. No. 5.730.969). También pueden añadirse conservantes adecuados tales como sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, dextrano y glicerina para estabilizar la formulación final (Howell y Miller, 1983). Puede añadirse a la formulación un estabilizador seleccionado de los tensioactivos no iónicos, D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, ácido D-glucurónico, sales del ácido D-glucurónico, trehalosa, dextranos, hidroxietil almidones y mezclas de éstos. La adición de una sal de metal alcalino o cloruro de magnesio puede estabilizar un polipéptido, opcionalmente incluyendo albúmina sérica y liofilización para incrementar más la estabilidad. Un polipéptido también puede estabilizarse poniéndolo en contacto con un sacárido seleccionado del grupo que consiste en dextrano, ácido condroitín sulfúrico, almidón, glucógeno, insulina, dextrina y sal del ácido algínico. Otros azúcares que pueden añadirse incluyen monosacáridos, disacáridos, alcoholes de azúcar y mezclas de éstos (por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manitol, xilitol). Los polioles pueden estabilizar un polipéptido y son miscibles en agua o solubles en agua. Los polioles adecuados pueden ser polihidroxi alcoholes, monosacáridos y disacáridos incluyendo manitol, glicerol, etilen glicol, propilen glicol, trimetil glicol, vinil pirrolidona, glucosa, fructosa, arabinosa, manosa, maltosa, sacarosa y polímeros de éstos. Véase, por ejemplo, Hanson y Roun (1992). Varios excipientes también pueden estabilizar a los polipéptidos, incluyendo albúmina sérica, aminoácidos, heparina, ácidos grasos y fosfolípidos, tensioactivos, metales, polioles, agentes reductores, agentes quelantes de metales, polivinil pirrolidona, gelatina hidrolizada y sulfato de amonio.

La vacuna tetánica de una única dosis puede estabilizarse en microesferas de poli(ácido láctico) (PLA) y poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) mediante la elección adecuada de excipiente o estabilizador (Sanchez et al., 1999). Ventajosamente, puede usarse trehalosa como un aditivo porque es un sacárido no reductor y, por lo tanto, no causa reacciones de aminocarbonilo con sustancias que presentan grupos amino tales como las proteínas.

Es concebible que una formulación que puede administrarse al sujeto en una forma seca, no líquida, pueda permitir el almacenamiento en condiciones que no requieren una cadena de frío. En una realización, un antígeno en disolución tal como el toxoide de la difteria se mezcla en disolución con un adyuvante tal como CT y se pone en una almohadilla de gasa con un soporte oclusivo tal como un envoltorio de plástico (Saran) y se deja secar. Este parche se puede poner en la piel con el lado de la gasa en contacto directo con la piel durante un periodo de tiempo y puede mantenerse en su sitio cubierto con un oclusivo simple tal como un envoltorio de plástico (por ejemplo, Envoltorio Saran) y cinta adhesiva. Dicho parche puede tener muchas composiciones. La matriz que alberga el antígeno puede ser gasa de algodón, combinaciones de rayón-nilón u otros materiales sintéticos y puede tener soportes sólidos oclusivos incluyendo cloruro de polivinilo, rayones, otros plásticos, geles, cremas, emulsiones, ceras, aceites, parafilm, gomas (sintéticas o naturales), telas o membranas. El parche puede mantenerse en la piel y los componentes del parche pueden mantenerse juntos usando varios adhesivos que son muy conocidos.

Una formulación líquida o casi líquida puede aplicarse directamente en la piel y dejar que se seque al aire; frotarla en la piel o cuero cabelludo; ponerla en las regiones de la oreja, inguinal o intertriginosa, especialmente en animales; ponerla en los tejidos anales/rectales; mantenerla en su sitio con un apósito, parche o material absorbente; inmersión; mantenerla de otra manera con un dispositivo tal como media, zapatilla, guante o camisa; o pulverizarla en la piel para maximizar el contacto con la piel. Pero, en esta invención, se prefiere una formulación con al menos un ingrediente activo en forma sólida. La formulación puede aplicarse en un apósito o gasa absorbente. La formulación puede cubrirse con un apósito oclusivo tal como, por ejemplo, AQUAPHOR (una emulsión de petrolato, aceite mineral, cera mineral, cera de lana, pantenol, bisabol y glicerina de Beiersdorf, Inc.), película de plástico, COMFEEL (Coloplast) o vaselina; o un apósito no oclusivo tal como, por ejemplo, TEGADERM (3M), DUODERM (3M) u OPSITE (Smith & Napheu). Un apósito oclusivo excluye el paso de agua. La formulación puede aplicarse en un único o múltiples sitios, en una única o múltiples extremidades, o en áreas superficiales grandes de la piel por inmersión completa. La formulación puede aplicarse directamente en la piel. Otros sustratos que pueden usarse son

adhesivos sensibles a presión tales como acrílicos, poliisobutilenos y siliconas. La formulación puede incorporarse directamente en dichos sustratos, quizá con el adhesivo per se en lugar de adsorción en una almohadilla porosa (por ejemplo, gasa) o tira con bilis (por ejemplo, papel de filtro).

Una formulación con adyuvante seco puede producirse de tal manera que sea un adyuvante universal; es decir, cualquier vacuna puede añadirse a la formulación básica con adyuvante seco. Dicho adyuvante universal puede incorporarse en un parche. La vacuna añadida puede ser acuosa y secarse posteriormente antes de la inmunización, o puede añadirse en un entorno acuoso y aplicarse a la vacuna.

Tanto si se usa un parche como si no, los polímeros añadidos a la formulación pueden actuar como un excipiente, estabilizador y/o conservante de un ingrediente activo así como reducir la concentración del ingrediente activo que satura una disolución usada para disolver la forma seca del ingrediente activo. Dicha reducción ocurre porque el polímero reduce el volumen eficaz de la disolución rellenando el espacio "vacío". Así, las cantidades de antígeno/adyuvante pueden conservarse sin reducir la cantidad de disolución saturada. Una consideración termodinámica importante es que un ingrediente activo en la disolución saturada se "dirigirá" a regiones de concentración menor (por ejemplo, a través de la piel). En disolución, los polímeros también pueden estabilizar y/o conservar la actividad de antígeno/adyuvante de los ingredientes solubilizados de la formulación. Dichos polímeros incluyen polímeros y copolímeros de etilen o propilen glicol, vinil pirrolidona y β-ciclodextrina.

ADMINISTRACIÓN TRANSCUTÁNEA DEL ANTÍGENO

La inmunización eficaz puede conseguirse con la invención porque la administración transcutánea del antígeno puede tener como diana la célula de Langerhans. Estas células se encuentran en abundancia en la piel y son células presentadoras de antígeno eficaces que dan lugar a la memoria de las células T y a respuestas inmunes potentes. Debido a la presencia de grandes números de células de Langerhans en la piel, la eficacia de la administración transcutánea puede relacionarse con el área superficial expuesta al antígeno y al adyuvante. De hecho, la razón de que la inmunización transcutánea sea tan eficaz puede ser que tiene como diana un número mayor de estas células presentadoras de antígeno eficaces que la inmunización intramuscular.

Prevemos que la invención incrementará el acceso a la inmunización, a la vez que induce una respuesta inmune potente. Debido a que la inmunización transcutánea no requiere inyección con una aguja hipodérmica (es decir, penetración en o a través de la dermis) y las complicaciones y dificultades de ésta, se reducen los requerimientos de personal capacitado, técnica estéril y equipos estériles. Además, disminuyen las barreras para la inmunización en múltiples sitios o para las inmunizaciones múltiples. También se prevé la inmunización con una única aplicación de la formulación.

La inmunización puede conseguirse usando la aplicación epicutánea de una única formulación de antígeno y adyuvante en forma sólida, opcionalmente cubierta con un apósito oclusivo, o usando otras tecnologías de parche. La inmunización podría proporcionarse por personal no capacitado y es susceptible de auto-aplicación. La inmunización a gran escala podría producirse dada la fácil accesibilidad a la inmunización. Además, un procedimiento de inmunización simple mejoraría el acceso a la inmunización de los pacientes pediátricos y los ancianos y de las poblaciones en los países del Tercer Mundo.

Un objeto de la invención es proporcionar un medio nuevo para la inmunización a través de la piel intacta sin perforar la piel. La inmunización transcutánea según la invención proporciona un método por el cual los antígenos y el adyuvante pueden administrarse al sistema inmune, especialmente células presentadoras de antígeno especializadas subyacentes de la piel (por ejemplo, células de Langerhans) sin requerir un sistema de administración basado en líquido.

Para las vacunas tradicionales, sus formulaciones se inyectaban a través de la piel con agujas. La inyección de las vacunas usando agujas conlleva determinados inconvenientes incluyendo la necesidad de agujas y jeringas estériles, personal médico capacitado para administrar la vacuna, molestias a causa de la inyección, enfermedades transmitidas por las agujas y complicaciones potenciales acarreadas por la perforación de la piel con agujas potencialmente reutilizables. La inmunización a través de la piel sin el uso de agujas hipodérmicas representa un avance para la administración de vacunas al evitar las agujas hipodérmicas.

Además, la inmunización transcutánea puede ser superior a la inmunización usando agujas hipodérmicas ya que hay más células inmunes que serían la diana por el uso de varias localizaciones que tienen como diana áreas superficiales grandes de la piel. Una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno suficiente para inducir una respuesta inmune puede administrarse transcutáneamente bien en una única localización cutánea o sobre un área de la piel que cubre múltiples campos de ganglios linfáticos de drenaje (por ejemplo, cervical, axilar, inguinal, epitroclear, popliteal, aquellos del abdomen y el tórax). Dichas localizaciones cercanas a numerosos ganglios linfáticos diferentes en localizaciones por todo el cuerpo proporcionarán un estímulo para el sistema inmune distribuido más ampliamente que cuando una pequeña cantidad de antígeno se inyecta en una única localización por inyección subcutánea intradérmica o intramuscular.

El antígeno que pasa a través de o a la piel puede encontrarse células presentadoras de antígeno que procesan el antígeno de manera que se induce una respuesta inmune. Los múltiples sitios de inmunización pueden reclutar un

número mayor de células presentadoras de antígeno y la población mayor de células presentadoras de antígeno que han sido reclutadas resultará en una mayor inducción de la respuesta inmune. Es concebible que el uso de la piel pueda administrar el antígeno a células fagocíticas de la piel tal como, por ejemplo, células dendríticas dérmicas, macrófagos y otras células presentadoras de antígeno de la piel; el antígeno también puede administrarse a las células fagocíticas del hígado, bazo y médula ósea que se sabe que sirven como las células presentadoras de antígeno a través de la corriente sanguínea o el sistema linfático.

Las células de Langerhans, células dendríticas y macrófagos pueden tomarse como diana específicamente usando antígeno unido a macroglobulina α2 u otros agentes que se sabe que tienen como diana APC conjugadas con o producidas recombinantemente como una proteína de fusión con adyuvante, antígeno o ambos. Las células de Langerhans, células dendríticas y macrófagos pueden tomarse como diana específicamente usando receptor de Fc o el receptor para IgE de alta afinidad (Bieber, 1997) conjugado con o producido recombinantemente como una proteína de fusión con adyuvante; también, el adyuvante puede conjugarse con o producirse recombinantemente como una proteína de fusión con proteína A o proteína G para tomar como diana la inmunoglobulina de la superficie de las células B. El resultado sería la distribución amplia del antígeno en las células presentadoras de antígeno en un grado que se consigue raramente, si se consigue, con las prácticas actuales de inmunización.

La inmunización genética se ha descrito en las Pat. U.S. Nos. 5.589.466, 5.593.972 y 5.703.055. El o los ácidos nucleicos contenidos en la formulación pueden codificar el antígeno, el adyuvante o ambos. El ácido nucleico puede o no ser capaz de replicación; puede ser no integrativo y no infeccioso. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar un polipéptido de fusión que comprende el antígeno y un dominio de ubiquitina para dirigir la respuesta inmune a una respuesta restringida de clase I. El ácido nucleico puede comprender además una región reguladora unida de manera operativa a la secuencia que codifica el antígeno o el adyuvante. El ácido nucleico puede añadirse con un adyuvante. El ácido nucleico puede formar un complejo con un agente que estimula la transfección tal como un lípido catiónico, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, polibreno-DMSO o una combinación de éstos; también, las células inmunes pueden tomarse como diana por la conjugación de ADN al receptor Fc o proteína A/G o uniendo ADN a un agente que lo une a macroglobulina α_2 o proteína A/G o material dirigido a APC similar. El ácido nucleico puede comprender regiones obtenidas de genomas virales. Dichos materiales y técnicas las describen Kriegler (1990) y Murray (1991).

Una respuesta inmune puede comprender brazos efectores humorales (es decir, anticuerpo específico de antígeno) y/o celulares (es decir, linfocitos específicos de antígeno tales como células B, células T CD4+. células T CD8+, CTL, células Th1, células Th2 y/o células T_{DTH}). Además, la respuesta inmune puede comprender células NK que median la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

La respuesta inmune inducida por la formulación de la invención puede incluir el estímulo de anticuerpos específicos de antígeno y/o de linfocitos citotóxicos (CTL, revisado en Alving y Wassef, 1994). El anticuerpo puede detectarse por técnicas de inmunoensayo y puede esperarse la detección de varios isotipos (por ejemplo, IgM, IgD, IgA1, IgA2, IgA de secreción, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Una respuesta inmune también puede detectarse con un ensayo de neutralización. Los anticuerpos son proteínas protectoras producidas por los linfocitos B. Son altamente específicos y generalmente tienen como diana un epítopo de un antígeno. Frecuentemente, los anticuerpos juegan un papel en la protección frente a enfermedades reaccionando específicamente con antígenos obtenidos de los patógenos que causan la enfermedad. La inmunización puede inducir anticuerpos específicos para el antígeno inmunizante, tal como la toxina del cólera.

Las CTL son células inmunes protectoras particulares producidas para proteger frente a la infección por un patógeno. También son altamente específicas. La inmunización puede inducir CTL específicas para el antígeno, tal como un oligopéptido sintético basado en una proteína de la malaria, en asociación con antígeno de histocompatibilidad mayor propio. Las CTL inducidas por la inmunización con el sistema de administración transcutánea pueden matar a las células infectadas con patógenos. La inmunización también puede producir una respuesta de memoria como se indica por las respuestas de refuerzo en anticuerpos y CTL, proliferación de linfocitos por cultivo de linfocitos estimulados con el antígeno y las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado frente al pulso intradérmico en la piel con el antígeno solo.

En un ensayo de neutralización viral, se añaden diluciones seriadas de suero a las células huésped que se observan para infección después del pulso con el virus infeccioso. Alternativamente, pueden incubarse diluciones seriadas de suero con titulaciones infecciosas del virus antes de la inoculación de un animal y los animales inoculados se observan para signos de infección.

El sistema de inmunización transcutánea de la invención puede evaluarse usando modelos de pulso en animales o seres humanos, que evalúan la capacidad de la inmunización con el antígeno para proteger al sujeto frente a la enfermedad. Dicha protección demostraría una respuesta inmune específica de antígeno. En lugar del pulso, generalmente se asume que el logro de titulaciones de anticuerpo anti-difteria de 5 UI/ml o mayores indica una protección óptima y sirve como marcador sucedáneo para la protección (Plotkin y Mortimer, 1994).

Además, el modelo del pulso con Plasmodium falciparum puede usarse para inducir una respuesta inmune específica de antígeno en los seres humanos. Pueden inmunizarse voluntarios humanos usando el sistema de

inmunización transcutánea que contiene oligopéptidos o proteínas (polipéptidos) obtenidos del parásito de la malaria y exponerlos a la malaria experimentalmente o en el entorno natural. El modelo del pulso de ratón con Plasmodium yoelii puede usarse para evaluar la protección en el ratón frente a la malaria (Wang et al., 1995).

El anticuerpo IgG o IgA específico de la toxina del cólera o específico de LT puede proporcionar protección frente al pulso con la toxina del cólera (Pierce, 1978; Pierce y Reynolds, 1974) y se sabe que IgG o IgA específico de LT protege frente a la enfermedad diarreica relacionada con ETEC.

La vacunación también se ha usado como un tratamiento para el cáncer, alergias y enfermedad autoinmune. Por ejemplo, la vacunación con un antígeno tumoral (por ejemplo, antígeno específico de la próstata) puede inducir una respuesta inmune en la forma de anticuerpos, CTL y proliferación de linfocitos que permite al sistema inmune corporal reconocer y matar a las células tumorales. Los antígenos tumorales útiles para la vacunación se han descrito para melanoma (Pat. U.S. Nos. 5.102.663, 5.141.742 y 5.262.177), carcinoma de próstata (Pat. U.S. No. 5.538.866) y linfoma (Pat. U.S. Nos. 4.816.249, 5.068.177 y 5.227.159). La vacunación con oligopéptido del receptor de la célula T puede inducir una respuesta inmune que detiene la progresión de la enfermedad autoinmune (Pat. U.S. Nos. 5.612.035 y 5.614.192; Antel et al., 1996; Vandenbark et al., 1996). La Pat. U.S. No. 5.552.300 también describe antígenos adecuados para tratar enfermedades autoinmunes.

Se pretende que el texto que sigue sea ilustrativo de la invención; sin embargo, la práctica de la invención no está limitada o restringida de ninguna manera por los ejemplos.

EJEMPLOS

Procedimiento de Inmunización

Se afeitó el dorso de ratones de 6 a 8 semanas con una afeitadora #40. Este afeitado pudo hacerse sin ningún signo de trauma en la piel. El afeitado se hizo desde el tórax medio justo hasta por debajo de la nuca. Se dejó descansar a los ratones durante 48 horas. Antes de esto, los ratones se etiquetaron en la oreja para su identificación y se tomó sangre antes de la inmunización para obtener una muestra de suero pre-inmune. Los ratones también se inmunizaron transcutáneamente sin afeitado aplicando hasta 50 μl de disolución inmunizante en cada oreja.

Los ratones se inmunizaron de la manera siguiente. Los ratones se anestesiaron con 0,03-0,06 ml de una disolución 20 mg/ml de xilazina y 0,5 ml de 100 mg/ml de ketamina para prevenir durante el procedimiento de inmunización. Los ratones se inmovilizaron por esta dosis de anestesia durante aproximadamente una hora. Pueden usarse dosis mayores o repeticiones cuando se necesita inmovilización durante periodos mayores. Los ratones se pusieron en una manta calefactora con el lado ventral hacia abajo.

La disolución de inmunización se puso en la piel dorsal afeitada de un ratón de la manera siguiente: una plantilla de 1,2 cm x 1,6 cm hecha de poliestireno se colocó suavemente en el lomo y se usó una gasa estéril humedecida con disolución salina para humedecer parcialmente la piel (esto permitió la aplicación uniforme de la disolución inmunizante), la disolución inmunizante se aplicó con una pipeta en el área circunscrita por la plantilla para rendir un parche de 2 cm^2 de disolución inmunizante. Alternativamente, la disolución inmunizante es aplica uniformemente en la oreja. Se tuvo cuidado para no raspar o frotar la piel con la punta de la pipeta. La disolución inmunizante se extendió alrededor del área que se quería cubrir con el lado suave de la punta de la pipeta.

Aproximadamente 100 μl de la disolución inmunizante se dejaron en el lomo del ratón durante una hora. El ratón se sostuvo suavemente por la nuca y la cola bajo una corriente copiosa de agua del grifo tibia (aproximadamente un litro) y se lavó. El ratón se secó cuidadosamente con palmaditas con una pieza de gasa estéril y se realizó un segundo lavado; el ratón se secó con palmaditas una segunda vez y se dejó en la jaula. No se observaron efectos adversos causados por los procedimientos de afeitado, anestesia, inmunización o lavado. No se observó ni eritema ni induración en el sitio de inmunización hasta 72 horas después de la exposición al antígeno. La inmunización usando la oreja se realizó como se ha descrito anteriormente excepto en que no se eliminó el pelo antes de la inmunización.

La producción de formulaciones secas y parches de la invención, así como su aplicación, se describe más adelante.

Antígeno

Los antígenos siguientes pueden usarse para la inmunización o ELISA: toxina del cólera o CT (List Biologicals, Campbell, CA, Cat #101B), subunidad B de CT (List Biologicals, Campbell, CA, Cat #BT01), subunidad A de CT (List Biologicals, Campbell, CA, Cat #102A), subunidad A de CT (Calbiochem, Cat #608562), toxina pertussis (List Biologicals, Campbell, CA), fragmento C o tetC tetánico (List Biologicals, Campbell, CA), toxoide tetánico (List Biologicals, Campbell, CA), toxina tetánica (List Biologicals, Campbell, CA), exotoxina A de *Pseudomonas* (List Biologicals, Campbell, CA), toxoide de la difteria (List Biologicals), enterotoxina sensible al calor de *E. coli* (Sigma, St. Louis, MO, lote #9640625), albúmina de suero bovino o BSA (Sigma, St. Louis, MO, Cat #3A-4503) y conjugado B de *Hemophilus influenza* (Connaught, lote #6J81401). Se mezclan con PBS o disolución salina normal estéril para disolverlos (es decir, una forma líquida) si no se pretende proporcionar el antígeno en forma seca.

ELISA - IgG (H+L)

Los anticuerpos específicos para los antígenos descritos se determinaron usando ELISA en una técnica similar a Glenn et al. (1995). Todos los antígenos se disolvieron en disolución salina estéril a una concentración de 2 μg/ml. Se pusieron cincuenta microlitros de esta disolución (0,1 μg) por pocillo en placas de poliestireno IMMULON-2 (Dynatech, Chantilly, VA) y se incubaron a temperatura ambiente toda la noche. Las placas se bloquearon con disolución de tampón de bloqueo 0,5% caseína/0,05% Tween 20 durante una hora. Los sueros se diluyeron con diluyente 0,5% caseína/0,05% Tween 20; se hicieron series de diluciones en las columnas de la placa. La incubación se hizo durante dos horas a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron en una disolución de lavado PBS-0,05% Tween 20 cuatro veces y el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón (H+L) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Bio-Rad, Richmond, CA, Cat #170-6516) se diluyó en diluyente de caseína a una dilución 1/500 y se dejó en las placas durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces en la disolución de lavado PBS-Tween. Se añadieron cien microlitros de sustrato ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolona) sulfónico (ABTS, Kirkegaard y Perry, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y las placas se leyeron a 405 nm después de aproximadamente 30 minutos de revelado. Los resultados se muestran como la media geométrica de los sueros individuales y el error estándar de la media de las unidades de ELISA (la dilución inversa de suero a la que la absorbancia es igual a 1,0) o como respuestas de anticuerpo individuales en unidades de ELISA. En todos los casos, los ensayos de ELISA se realizan para descartar el papel de la reactividad cruzada entre los antígenos coadministrados.

ELISA - IgG(γ), IgM(μ) e IgA(α)

Los niveles de los anticuerpos IgG(γ), IgM(μ) e IgA(α) anti-CT se determinaron usando ELISA con una técnica similar a Glenn et al. (1995). CT se disuelve en disolución salina estéril a una concentración de 2 μg/ml. Se pusieron cincuenta microlitros de esta disolución (0,1 μg) por pocillo en placas de poliestireno IMMULON-2 (Dynatech, Chantilly, VA) y se incubaron a temperatura ambiente toda la noche. Las placas se bloquearon con una disolución de tampón de bloqueo 0,5% caseína- Tween 20 durante una hora. Los sueros se diluyeron en diluyente de caseína y se hicieron diluciones seriadas en la placa. Ésta se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron en una disolución de lavado PBS-Tween cuatro veces y el anticuerpo secundario IgG (γ) de cabra anti-ratón conjugado con HRP (Bio-Rad, Richmond, CA, Cat #172-1038), IgM (μ) de cabra anti-ratón conjugado con HRP (Bio-Rad, Richmond, CA, Cat #172-1030) o IgA de cabra anti-ratón (Zymed, South San Francisco, CA) se diluyó en diluyente de caseína a una dilución 1/1.000 y se dejó en las placas durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces en la disolución de lavado PBS-Tween. Se añadieron cien microlitros de sustrato ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolona) sulfónico (ABTS, Kirkegaard y Perry, Gaithersburg, MD) a los pocillos y las placas se leyeron a 405 nm. Los resultados se muestran como la media geométrica de los sueros individuales y el error estándar de la media de las unidades de ELISA (la dilución inversa de suero a la que la absorbancia es igual a 1,0).

ELISA - Subclases de IgG

La subclase del anticuerpo IgG específica de antígeno (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) frente a CT, LT, ETA y BSA se realiza como describen Glenn et al. (1995). El ELISA en fase sólida se realiza en placas de poliestireno IMMULON-2 (Dynatech, Chantilly, VA). Los pocillos se incuban con los antígenos respectivos a 0,1 μg/50 μl en disolución salina toda la noche y se bloquean con 0,5% caseína-Tween 20. Los sueros individuales de los ratones diluidos en 0,5% caseína se diluyen de manera seriada y se incuban a temperatura ambiente durante cuatro horas. El anticuerpo secundario consiste en anticuerpo de isotipo específico (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, The Binding Site, San Diego, CA) de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano. Se determina una curva estándar para cada subclase usando IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 de mieloma de ratón (The Binding Site, San Diego, CA), Los pocillos estándar se recubren con IgG de cabra anti-ratón (H+L) (Bio-Rad, Richmond, CA, Cat #172-1054) para capturar los estándares de la subclase de IgG de mieloma que se añaden en diluciones seriadas. La subclase de IgG de mieloma también se detecta usando el anticuerpo específico de la subclase de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa. Tanto los sueros de ensayo como los estándares de mieloma se detectan usando ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolona) sulfónico (ABTS, Kirkegaard y Perry, Gaithersburg, MD) como sustrato. Las absorbancias se leen a 405 nm. Las subclases individuales específicas de antígeno se cuantifican usando los valores de la curva lineal de titulación calculados frente a la curva estándar de mieloma y se muestran como μg/ml.

ELISA - IgE

La cuantificación del anticuerpo IgE específico de antígeno se realiza usando un protocolo de Pharmingen Technical Protocols, página 541 del Catálogo de Research Products, 1996-1997 (Pharmingen, San Diego, CA). Se añaden cincuenta microlitros de 2 μg/ml de mAb IgE de captura anti-ratón purificado (Pharmingen, Cat #02111D) en 0,1 M $NaHCO_3$ (pH 8,2) a placas IMMUNO (Nunc, Cat #12-565-136). Las placas se incuban toda la noche a temperatura ambiente, se lavan tres veces con PBS-Tween 20, se bloquean con 3% BSA en PBS durante dos horas y se lavan tres veces con PBS-Tween. Los sueros se diluyen en 1% BSA en PBS, se añaden a diluciones 1/100 y se diluyen de manera seriada hacia abajo de las columnas (por ejemplo, 1/100, 1/200, etcétera). Los estándares de IgE de ratón

purificados (Pharmingen, Cat #0312D) se añaden con una dilución de partida de 0,25 μg/ml y se diluyen de manera seriada hacia abajo de las columnas. Las placas se incuban durante dos horas y se lavan cinco veces con PBS-Tween.

Se incuba mAb IgE anti-ratón biotinilado (Pharmingen, Cat #02122D) a 2 μg/ml en 1% BSA en PBS durante 45 minutos y se lava cinco veces con PBS-Tween. Se añade avidina-peroxidasa (Sigma A3151, 1:400 de disolución 1 mg/ml) durante 30 min y las placas se lavan seis veces con PBS-Tween. Tanto los sueros de ensayo como los estándares de IgE se detectan usando ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolona) sulfónico (ABTS, Kirkegaard y Perry, Gaithersburg, MD) como sustrato. Las absorbancias se leen a 405 nm. Las subclases individuales específicas de antígeno se cuantifican usando los valores de la curva lineal de titulación calculados frente a la curva estándar de IgE y se muestran como μg/ml.

Lavados Pulmonares y Recogida de Heces

Los lavados pulmonares se obtuvieron después de sacrificar el ratón en el día del pulso. La tráquea se secciona, se inserta un tubo de polipropileno de calibre 22 y se infunde PBS para inflar suavemente los pulmones. La disolución de lavado se extrae, se reinfunde durante un total de tres ciclos y se almacena a -20^{0}C. Las bolitas de heces se recogen el día anterior al pulso después de defecación espontánea. Las bolitas se pesan, se homogeneizan en 1 ml de PBS por 100 μg de material fecal, se centrifugan y el sobrenadante se recoge y se almacena a -20^{0}C hasta que se ensaya.

Pulso con Toxina

Los ratones se anestesian con xilazina:ketamina y se someten a un pulso intranasalmente con 20 μl de CT (Calbiochem, La Jolla, CA) a 1 mg/ml en 10 mM TRIS (pH 7,5). Los ratones se someten a un pulso bajo anestesia por la administración intranasal de 20 μg en tampón divididos equitativamente entre cada orificio nasal. Después del pulso, los ratones se observan diariamente y se registra tanto la morbilidad como la mortalidad.

Análisis Estadístico

A no ser que se indique otra cosa, los datos se representan como la media geométrica y SEM. La comparación entre las titulaciones de anticuerpo en los grupos se realiza usando ensayos *t* de una cola apareados o no apareados y los valores $p<0,05$ se consideran como significativos. Para los estudios de pulso, los grupos se comparan con el ensayo Exacto de Fisher (SigmaStat, SPSS, Chicago, IL).

Producción de un Parche

El revestimiento antiadherente (CO55, material R&D) se quitó del laminado acrílico adhesivo (K0021F, material R&D #S961006), el laminado adhesivo se aplicó al soporte (1012, material R&D), se enrolló y la tira de papel de embalaje se quitó para exponer el laminado acrílico adhesivo. Se enrolló una gasa de cuatro capas (Johson & Johnson) en cuadrados de 10 cm x 10 cm en el soporte mencionado anteriormente mantenido por el laminado acrílico adhesivo. Se perforan unidades redondas de un cm^2 de la gasa (**1**) en el soporte (**2**) adecuadas para usarse con una única dosis de formulación.

El revestimiento antiadherente se quitó de laminado acrílico adhesivo adicional, el laminado acrílico adhesivo se aplicó en apósito oclusivo TEGADERM de CoTran 9701 (2 mil P.U.T., material R&D SLP#P261450143), se enrolló y la tira de papel de embalaje se quitó para exponer el laminado acrílico adhesivo. Una unidad de gasa (**1**) en soporte (**2**) se puso con pinzas en el apósito oclusivo mencionado anteriormente (**3**) con el lado de la gasa hacia arriba y el lado del apósito hacia abajo, mantenidos juntos por el laminado acrílico adhesivo. El lado de la gasa se cubrió con el revestimiento antiadherente quitado previamente, se enrolló y se cortó en rectángulos de 2 cm x 2,5 cm con la unidad en el centro.

El parche construido como se ha descrito anteriormente se muestra esquemáticamente en sección transversal en la Fig. 1. Puede prepararse bajo condiciones asépticas y almacenarse a temperatura ambiente. El parche puede mantenerse estéril cubriendo el parche con el revestimiento antiadherente (**4**) en el lado de la gasa y el papel de embalaje (**5**) en el lado del apósito.

Ejemplo 1. Inmunización de ratones después de la aplicación epicutánea de antígeno liofilizado, 160 μg de toxina del cólera, en la piel.

Se inmunizaron ratones C57BL6 usando toxina del cólera (CT) de la manera siguiente: 2 mg de CT liofilizada (List Biological, Campbell, CA) se tomaron cuidadosamente del vial original, se pesaron en un trozo de papel (1,28 mg recuperados) y se dividieron en ocho partes aproximadamente iguales de 160 μg cada una. Los ratones que se inmunizaron con polvo tenían 160 μg de CT cepillados cuidadosamente del papel en la piel. Los ratones se anestesiaron y se afeitaron antes de la inmunización y se dejó el polvo inmunizante en la piel durante una hora, después de la cual los ratones se lavaron concienzudamente. El pretratamiento de la piel con agua implicó esencialmente humedecer la piel durante 5 minutos, secar la piel con papel y poner el polvo o la disolución inmunizante en la piel. Los ratones inmunizados con líquido se inmunizaron con 100 μl de 1 mg/ml CT en disolución

salina. Los anticuerpos se detectaron por ELISA, como se ha descrito, dos semanas después de la inmunización inicial. Sólo se requirió una única inmunización. La media geométrica (media geo) se calculó a partir de las titulaciones restadas (titulación de 14 días menos sangre antes de la inmunización). Véase la Tabla 1 para resultados.

Los ratones inmunizados con una disolución salina de CT demostraron respuestas inmunes típicas como se ha mostrado previamente usando inmunización transcutánea. Cuando se puso el polvo en la piel, los ratones desarrollaron claramente altos niveles de anticuerpos. Cuando la piel se hidrata antes de la inmunización, tanto el antígeno administrado en forma acuosa como el antígeno administrado en forma de polvo fueron capaces de inducir unos niveles muy altos de anticuerpos. Pero los ratones inmunizados con el polvo seco consiguieron unos niveles más altos de anticuerpos de manera consistente.

Tabla 1.

etiqueta en la oreja #	pretratamiento	Forma del antígeno	IgG anti-CT (unidades de ELISA)		
			sangre antes de la inmunización	titulación 14 días	media geo
967	ninguno	líquido	<5	2.637	1.465
969	ninguno	líquido		814	
996	ninguno	polvo	<5	11.395	4.957
997	ninguno	polvo		3.223	
998	ninguno	polvo		10.067	
999	ninguno	polvo		1.633	
970	H_2O	líquido	<5	12.316	25.356
971	H_2O	líquido		26.777	
965	H_2O	líquido		49.434	
961	H_2O	polvo	<5	26.966	29.490
962	H_2O	polvo		39.211	
963	H_2O	polvo		26.612	
964	H_2O	polvo		26.879	

Ejemplo 2. Inmunización de ratones después de la aplicación epicutánea de antígeno liofilizado, 50 μg de toxina del cólera, en la piel.

Tabla 2.

Etiqueta en la oreja #	pretratamiento	forma del antígeno	IgG anti-CT (unidades de ELISA)		
			sangre antes de la inmunización	titulación 14 días	media geo
11.707	ninguno	líquido	<10	2.271	251
11.708	ninguno	líquido		327	
11.709	ninguno	líquido		247	
11.710	ninguno	líquido		286	
11.711	ninguno	líquido		19	
11.712	ninguno	polvo	<10	53	555
11.713	ninguno	polvo		1.750	
11.714	ninguno	polvo		954	
11.715	ninguno	polvo		1.731	
11.716	ninguno	polvo		342	
11.717	H_2O	líquido	<10	8.645	11.826
11.718	H_2O	líquido		14.958	
11.719	H_2O	líquido		13.622	
11.720	H_2O	líquido		13.448	
11.721	H_2O	líquido		9.765	
11.722	H_2O	polvo	<10	4.614	4.487
11.723	H_2O	polvo		7.451	
11.724	H_2O	polvo		2.536	
11.725	H_2O	polvo		3.580	
11.726	H_2O	polvo		5.823	
11.727	alc/H_2O	líquido	<10	4.656	7.595
11.728	alc/H_2O	líquido		8.131	
11.729	alc/H_2O	líquido		3.728	
11.730	alc/H_2O	líquido		11.135	
11.731	alc/H_2O	líquido		15.797	
11.732	alc/H_2O	polvo	<10	22.100	7.327
11.733	alc/H_2O	polvo		6.607	
11.734	alc/H_2O	polvo		6.204	
11.735	alc/H_2O	polvo		7.188	
11.736	alc/H_2O	polvo		3.244	

Se inmunizaron ratones C57BL6 usando la toxina del cólera (CT) de la manera siguiente: 1 mg de CT liofilizada (List Biological, Campbell, CA) se tomó cuidadosamente del vial original, en un trozo de papel y se dividió en 20 partes iguales de 50 μg cada una. Los ratones que se inmunizaron con polvo tenían 50 μg de CT cepillados cuidadosamente del papel en la piel. Los ratones se anestesiaron y se afeitaron antes de la inmunización y se dejó el polvo inmunizante en la piel durante una hora, después de la cual los ratones se lavaron concienzudamente. El pretratamiento de la piel con agua (H_2O) implicó esencialmente humedecer la piel durante 5 minutos, secar la piel con gasa y poner el polvo o la disolución inmunizante en la piel. A los ratones que se frotaron con alcohol (alc) antes de la inmunización se les frotó cuidadosamente con hisopo de alcohol isopropílico (70%) 20 veces sobre la piel. Los ratones inmunizados con líquido se inmunizaron con 50 μl de 1 mg/ml CT en disolución salina. Los anticuerpos se detectaron por ELISA, como se ha descrito, dos semanas después de la inmunización inicial. Sólo se requirió una única inmunización. La media geométrica (media geo) se calculó a partir de las titulaciones restadas (titulación de 14 días menos sangre antes de la inmunización). Véase la Tabla 2 para los resultados.

Los ratones inmunizados con una disolución salina de CT demostraron respuestas inmunes típicas como se ha mostrado previamente usando inmunización transcutánea. De nuevo, cuando se puso el polvo en la piel, los ratones desarrollaron claramente altos niveles de anticuerpos. Cuando la piel se hidrató antes de la inmunización, tanto el antígeno administrado en forma acuosa como el antígeno administrado en forma de polvo fueron capaces de inducir unos niveles altos de anticuerpos. Los ratones inmunizados usando el polvo seco consiguieron unos niveles muy altos de anticuerpos con respuestas altas de manera consistente. El frotado con alcohol no pareció interferir con las respuestas inmunes inducidas por la inmunización con polvo. Este segundo experimento muestra que las formulaciones secas pueden usarse en la inmunización, con o sin pretratamiento de la piel.

Ejemplo 3. Inmunización de ratones después de la aplicación epicutánea de antígeno liofilizado, 25 μg de toxina del cólera, en la piel en una cepa de ratón con respuesta intermedia.

Se inmunizaron ratones BALB/c usando toxina del cólera (CT) de la manera siguiente. 5 mg de CT liofilizada (List Biological, Campbell, CA) se disolvieron en 1 ml de agua estéril para hacer una disolución 5 mg/ml. Para la inmunización con polvo, se dejó que 5 μl de esta disolución se secaran al aire a temperatura ambiente en un porta de vidrio. El polvo residual se raspó y se puso en el lomo de la piel del ratón que se va a inmunizar. Así, los ratones que se inmunizaron con polvo tenían 25 μg de CT cepillados cuidadosamente del porta en la piel. Los ratones que se inmunizaron con el parche seco tenían una parte de 1 cm x 1 cm de un papel de seda KIMWIPE en el que se pusieron 5 μl de 5 mg/ml de CT en un cuadrado de 4 cm x 4 cm de envoltorio de plástico (Saran) y se dejó que se secara al aire a temperatura ambiente. El papel de seda y el envoltorio de plástico se pusieron con el papel de seda en contacto directo con la piel del ratón que se va a inmunizar y se cubrió con el envoltorio de plástico. El parche "húmedo" usó un papel de seda y el "parche" de envoltorio de plástico preparado con una técnica similar, con la excepción de que se pipetearon 30 μl de agua estéril en el parche seco después de que se pusiera en la piel y el envoltorio de plástico se puso sobre el parche húmedo.

Tabla 3.

etiqueta en la oreja #	pretratamiento	forma del antígeno	IgG anti-CT (unidades de ELISA)		
			sangre antes de la inmunización	titulación 14 días	media geo
806	H_2O	líquido	<10	3.177	1.011
807	H_2O	líquido		773	
809	H_2O	líquido		266	
810	H_2O	líquido		1.976	
825	H_2O	líquido		820	
821	H_2O	parche seco	<10	37.020	5.315
822	H_2O	parche seco		15.090	
823	H_2O	parche seco		12.952	
824	H_2O	parche seco		7.419	
808	H_2O	parche seco		79	
826	ninguno	parche húmedo	<10	11.959	8.042
827	ninguno	parche húmedo		24.894	
828	ninguno	parche húmedo		11.614	
829	ninguno	parche húmedo		10.658	
830	ninguno	parche húmedo		913	
831	H_2O	polvo	<10	9.504	4.955
832	H_2O	polvo		4.996	
833	H_2O	polvo		9.841	
834	H_2O	polvo		358	
835	H_2O	polvo		17.854	
836	ninguno	polvo	<10	63	17
837	ninguno	polvo		6	
838	ninguno	polvo		275	
839	ninguno	polvo		3	
840	ninguno	polvo		4	

Los ratones se anestesiaron y se afeitaron antes de la inmunización y se dejó el polvo inmunizante en la piel durante una hora, después de la cual los ratones se lavaron concienzudamente. El pretratamiento de la piel con agua (H_2O) implicó esencialmente humedecer la piel durante 5 minutos, secar la piel con gasa y poner el polvo o disolución inmunizante en la piel. Los ratones inmunizados con líquido se inmunizaron con 25 μl de 1 mg/ml CT en disolución salina. Los anticuerpos se detectaron por ELISA, como se ha descrito, dos semanas después de la inmunización inicial. Sólo se requirió una única inmunización. La media geométrica (media geo) se calculó a partir de las titulaciones restadas (titulación de 14 días menos sangre antes de la inmunización). Véase la Tabla 3 para los resultados.

Los ratones inmunizados con una disolución salina de CT en la piel pretratada demostraron respuestas inmunes típicas como se ha mostrado previamente usando inmunización transcutánea con ratones BALB/c (ratones con respuesta modesta). De nuevo, cuando se puso el polvo en la piel, los ratones desarrollaron claramente altos niveles de anticuerpos cuando la piel se hidrata antes de la inmunización. Tanto el parche puesto en la piel hidratada como

el parche hidratado en el momento de la inmunización consiguieron niveles altos de anticuerpos con respuestas altas de manera consistente. Ester tercer experimento muestra que la formulaciones secas pueden usarse en forma de parche para la inmunización en la piel.

Ejemplo 4. Titulaciones de IgA e IgG de suero anti-influenza en respuesta a inmunización transcutánea con formulaciones de antígeno líquidas o secas. Se inmunizaron ratones C57BL/6 (cinco por grupo) con 50 μg de la cepa de influenza A/Syd/5/97 (Flu A) y 60 μg de subunidad B de la toxina del cólera purificada (pCTB) en formulación líquida o sólida.

Brevemente, se afeitaron los lomos de los ratones desde el aspecto distal del omóplato hasta 0,5 cm por encima de la base de la cola 48 horas antes de la inmunización. En el día de la inmunización, los ratones se inmovilizaron por inyección de 30 μl de una mezcla de anestesia dando lugar a una dosis final de aproximadamente 83 mg/kg de ketamina y 8,3 mg/kg de xilazina. El lomo de cada ratón se hidrató pasando 10 veces una almohadilla de gasa saturada con agua. Se dejó una cantidad de agua en el lomo durante aproximadamente 5 minutos. El exceso de agua se secó con una almohadilla de gasa seca antes de aplicar el antígeno.

Para los parches secos, la disolución del antígeno se mezcló el día antes de la inmunización y se cortó un parche adhesivo transparente de 1,25 x 2,5 cm de un parche placebo proporcionado por Elan Corporation. Se aplicaron doscientos microlitros de antígeno/adyuvante en disolución salina en la superficie adhesiva poniendo 100 μl de antígeno y secando al aire durante varias horas, seguido de la colocación de otros 100 μl y secar al aire toda la noche.

Para los grupos de parche líquido, se aplicaron en el lomo 200 μl de disolución salina que contenía (Flu A/pCTB) ó 100 μl de disolución salina que contenía pCTB. Los animales se inmunizaron como se ha descrito anteriormente a las 0, 3 y 6 semanas. El suero se recogió antes de cualquier exposición al antígeno/adyuvante (es decir, sangre antes de la inmunización) y tres semanas después de la tercera inmunización. Se evaluaron las titulaciones de anticuerpo específico de antígeno por un ELISA en fase sólida usando el antígeno de influenza A como la proteína de recubrimiento. Las muestras se diluyeron 1:100 en diluyente.

Véase la Tabla 4 para los resultados de las titulaciones de IgA sérica. Después de la inmunización, los animales de los grupos de la formulación sólida y líquida desarrollaron titulaciones elevadas de IgA anti-influenza A comparadas con las titulaciones observadas en las muestras de sangre antes de la inmunización o de ratones inmunizados sólo con el adyuvante (pCTB). Tres animales del grupo del parche seco presentaron incrementos de 2 veces o más respecto a la sangre antes de la inmunización mientras que sólo un animal del grupo del antígeno líquido presentó un incremento de 2 veces.

Tabla 4.

		IgA sérica anti-influenza A (DO 405 nm)				
Flu A (60 μg) pCTB (μg)	Parche seco	Sangre antes de la inmunización medio			Etiqueta en la oreja#	
			13.646	13.647	13.648	13.649	13.650
		0,065	0,039	0,173	0,151	0,082	0,261
Flu A (60 μg) pCTB (50 μg)	Líquido	Sangre antes de la inmunización medio			Etiqueta en la oreja#	
			13.666	13.667	13.668	13.669	13.670
		0,076	0,065	0,073	0,640	0,076	0,105
pCTB (50 μg)	Líquido	Sangre antes de la inmunización medio			Etiqueta en la oreja#	
			13.641	13.642	13.643	13.644	13.645
		0,057	<0,020	0,010	0,031	0,032	0,078

Véase la Tabla 5 para los resultados sobre las titulaciones de IgG sérica. Después de la inmunización, los animales de los grupos de la formulación sólida y líquida desarrollaron titulaciones elevadas de IgG anti-influenza A comparadas con las titulaciones observadas en las muestras de sangre antes de la inmunización de ratones inmunizados sólo con el adyuvante (pCTB). Los resultados se muestran en unidades de ELISA, la dilución inversa a la cual la DO 405 nm es 1,0. Comparado con el grupo del antígeno solo, en el que la titulación máxima fue 47, dos

de cinco ratones en el grupo del antígeno seco y cuatro de cinco ratones en el grupo del antígeno líquido desarrollaron titulaciones elevadas de IgG específicas de antígeno.

Tabla 5.

		IgG sérica anti-influenza A (unidades de ELISA)				
Flu A (60 μg) pCTB (50 μg)	Parche seco	Sangre antes de la inmunización medio			Etiqueta en la oreja#	
		13.646	13.647	13.648	13.649	13.650
		5	31	12	32	547	2.060
Flu A (60 μg) pCTB (50 μg)	Líquido	Sangre antes de la inmunización medio			Etiqueta en la oreja#	
		13.666	13.667	13.668	13.669	13.670
		20	489	30	870	97	9.192
pCTB (50 μg)	Líquido	Sangre antes de la inmunización medio			Etiqueta en la oreja#	
		13.641	13.642	13.643	13.644	13.645
		8	44	13	17	47	17

Ejemplo 5. Respuestas de IgG sérica específicas de antígeno después de la inmunización transcutánea con formulaciones líquidas o secas. Se inmunizaron ratones C57BL/6 (cinco por grupo) en la piel con 25 μg de enterotoxina sensible al calor (LT) y 100 μg de toxoide de la difteria (DT) en formulaciones secas o líquidas.

Brevemente, se afeitaron los lomos de los ratones desde el aspecto distal del omóplato hasta 0,5 cm por encima de la base de la cola 48 horas antes de la inmunización. En el día de la inmunización, los ratones se inmovilizaron por inyección de 30 μl de una mezcla de anestesia dando lugar a una dosis final de aproximadamente 83 mg/kg de ketamina y 8,3 mg/kg de xilazina. El lomo de cada ratón se hidrató pasando 10 veces una almohadilla de gasa saturada con agua. Se dejó una cantidad de agua en el lomo durante aproximadamente 5 minutos. El exceso de agua se secó con una almohadilla de gasa seca antes de aplicar el antígeno.

Para los grupos del parche, las disoluciones de antígeno se mezclaron 48-72 horas antes de la inmunización. Los parches se construyeron como sigue. Para los grupos 1-5, se cortó un parche adhesivo transparente de 1,25 x 2,5 cm de un parche placebo proporcionado por Elan Corporation. Grupo 1, se cortó un trozo de 0,6 cm por 1,5 cm de papel de seda KIMWIPE y se puso en un parche adhesivo; se aplicaron 25 μl de la disolución de antígeno en la superficie del papel de seda y se dejó secar al aire toda la noche. Grupo 2, se cortó un trozo de 0,6 cm por 1,5 cm de papel de seda y se puso en un parche adhesivo; se aplicaron 25 μl de la disolución de antígeno en la superficie del papel de seda y se liofilizó toda la noche. Grupo 3, se aplicaron 25 μl de la disolución de antígeno en la superficie adhesiva y se dejó secar al aire toda la noche. Grupo 4, se aplicaron 25 μl de la disolución de antígeno en la superficie adhesiva y se liofilizó toda la noche. Grupo 5, 1/5 de un vial de DT se mezcló con 1/40 de un vial de LT y se puso directamente en la superficie adhesiva. Grupo 7, 1/5 de un vial de DT se mezcló con 1/40 de un vial de enterotoxina sensible al calor y se puso directamente en el lomo de los ratones. Grupo 9, se aplicaron 25 μl de disolución salina que contenía el antígeno en el lomo del animal.

Los ratones se inmunizaron como se ha descrito anteriormente a las 0, 3 y 5 semanas. El suero se recogió antes de cualquier exposición a antígeno/adyuvante (es decir, sangre antes de la inmunización) y cuatro semanas después de la tercera inmunización. Se evaluaron las titulaciones de anticuerpo específico de antígeno por un ELISA en fase sólida usando antígeno LT o DT como la proteína de recubrimiento. Las muestras se diluyeron de manera seriada empezando en 1:100 en diluyente.

Los resultados de las Tablas 6 y 7 se muestran en unidades de ELISA, la dilución inversa a la que la DO 405 nm es 1,0. Después de la inmunización, los animales de los grupos de la formulación sólida y líquida desarrollaron titulaciones elevadas de IgG anti-LT (Tabla 6) y anti-DT (Tabla 7) comparadas con la titulación media de las muestras de sangre antes de la inmunización (< 10 unidades). Conjuntamente, estos resultados indican que tanto las formulaciones secas como liofilizadas de antígeno/adyuvante pueden usarse para administrar el antígeno a través de la piel y que el antígeno puede aplicarse en una forma seca, en polvo, directamente o en un soporte adhesivo simple.

Tabla 6.

Grupo	Materiales del Parche	Formulación Antígeno/Adyuvante	IgG sérica anti-LT (unidades de ELISA)				
1	Soporte adhesivo	Secada en papel de seda	Etiqueta en la oreja#				
			12.601	12.265	12.266	12.268	12.269
			51.839	18.049	15.498	19.770	27.196
2	Soporte adhesivo	Liofilizada en papel de seda	Etiqueta en la oreja#				
			12.602	12.271	12.272	12.273	12.274
			9.507	27.188	4.562	19.975	11.204
3	Soporte adhesivo	Secada en el soporte adhesivo	Etiqueta en la oreja#				
			12.603	12.604	12.276	12.778	12.279
			18.305	7.847	21.263	20.013	43.500
4	Soporte adhesivo	Liofilizada en el soporte adhesivo	Etiqueta en la oreja#				
			12.605	12.606	12.281	12.282	12.283
			14.554	14.720	26.337	34.825	20.509
5	Soporte adhesivo	Polvo en el soporte adhesivo	Etiqueta en la oreja#				
			12.285	12.286	12.289	12.619	12.620
			35.787	45.075	16.326	67.213	48.214
7	Ninguno	Polvo	Etiqueta en la oreja#				
			12.295	12.298	400	622	623
			68.768	27.596	31.289	40.326	66.530
9	Ninguno	Líquido	Etiqueta en la oreja#				
			12.305	12.308	12.309	12.607	12.625
			17.049	47.980	75.772	30.734	13.212

Tabla 7.

Grupo	Materiales del Parche	Formulación Antígeno/Adyuvante	IgG sérica anti-DT (unidades de ELISA)				
1	Soporte adhesivo	Secada en papel de seda	Etiqueta en la oreja#				
			12.601 16.909	12.265 27.135	12.266 43.525	12.268 14.166	12.269 21.432
2	Soporte adhesivo	Liofilizada en papel de seda	Etiqueta en la oreja#				
			12.602 2.697	12.271 662	12.272 4.776	12.273 539	12.274 1.394
3	Soporte adhesivo	Secada en el soporte adhesivo	Etiqueta en la oreja#				
			12.603 58.504	12.604 883	12.276 12.063	12.778 27.061	12.279 6.544
4	Soporte adhesivo	Liofilizada en el soporte adhesivo	Etiqueta en la oreja#				
			12.605 17.867	12.606 20.747	12.281 21.065	12.282 15.623	12.283 14.323
5	Soporte adhesivo	Polvo en el soporte adhesivo	Etiqueta en la oreja#				
			12.285 713	12.286 9.787	12.289 601	12.619 3.329	12.620 5.178
7	ninguno	Polvo	Etiqueta en la oreja#				
			12.295 35.579	12.298 18.946	400 20.351	622 17.804	623 8.957
9	ninguno	Líquido	Etiqueta en la oreja#				
			12.305 5.421	12.308 18.166	12.309 14.061	12.607 40.605	12.625 47.666

Ejemplo 6. Respuestas de IgG sérica específicas de antígeno después de la inmunización transcutánea con varias dosis de enterotoxina sensible al calor (LT) y una cantidad constante de toxoide de la difteria (DT). Se inmunizaron ratones C57BL/6 (cinco por grupo) en la piel con formulaciones secas o líquidas que contenían de 6 μg a 200μg de LT y 100 μg de DT.

Brevemente, se afeitaron los lomos de los ratones desde el aspecto distal del omóplato hasta 0,5 cm por encima de la base de la cola 48 horas antes de la inmunización. En el día de la inmunización, los ratones se inmovilizaron por inyección de 30 μl de una mezcla de anestesia dando lugar a una dosis final de aproximadamente 83 mg/kg de ketamina y 8,3 mg/kg de xilazina. El lomo de cada ratón se hidrató pasando 10 veces una almohadilla de gasa saturada con agua. Se dejó una cantidad de agua en el lomo durante aproximadamente 5 minutos. El exceso de agua se secó con una almohadilla de gasa seca antes de aplicar el antígeno.

Grupos 1-6, las disoluciones de antígeno se mezclaron 48-72 horas antes de la inmunización. Grupo 10, el antígeno se preparó en el día de la inmunización. Para los grupos que recibieron parches, se cortó un trozo de 1,25 cm por 2,5 cm de celofán de material disponible comercialmente. Se cortaron trozos de un cm^2 de papel de seda KIMWIPE y se pusieron en los trozos de celofán. Se pusieron veinticinco microlitros de disolución salina que contenía 100 μg de DT y LT (200 μg, grupo 1; 100 μg grupo 2; 50 μg grupo 3; 25 μg, grupo 4; 12,5 μg, grupo 5; 6,2 μg, grupo 6) en la superficie del papel de seda de los parches de papel de seda/celofán. Se dejó que la disolución de antígeno se secara a temperatura ambiente toda la noche. Para el grupo 10, se puso un volumen de 25 μl de la disolución de antígeno directamente en la piel del ratón. En todos los grupos, la formulación se aplicó durante 30 minutos tras lo cual la formulación remanente se eliminó lavando la superficie del sitio de la inmunización con cantidades copiosas de agua. El suero se recogió antes de cualquier exposición a antígeno/adyuvante (es decir, sangre antes de la inmunización) y cuatro semanas después de la tercera inmunización. Se evaluaron las titulaciones de anticuerpo específico de antígeno por un ELISA en fase sólida usando antígeno LT o DT como la proteína de recubrimiento. Las muestras se diluyeron de manera seriada empezando en 1:100 en diluyente.

Después de la inmunización, los animales de los grupos de la formulación sólida y líquida desarrollaron titulaciones elevadas de IgG anti-LT (Tabla 8) y anti-DT (Tabla 9) comparadas con las titulaciones observadas en las muestras de sangre antes de la inmunización. Los resultados se muestran en unidades de ELISA, la dilución inversa a la que la DO 405 nm es 1,0. Conjuntamente, estos resultados indican que las formulaciones secas de antígeno/adyuvante pueden usarse para administrar el antígeno a través de la piel durante la inmunización epicutánea y que pequeñas cantidades de adyuvante (LT) pueden provocar titulaciones elevadas de anticuerpo.

Tabla 8.

Grupo	Dosis de LT	Forma del Antígeno		IgG sérica anti-LT (unidades de ELISA)				
1	200 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.350	12.351	12.352	12.353	12.354
				62.019	38.733	71.911	59.745	128.381
2	100 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.355	12.356	12.357	12.358	12.359
				53.371	45.852	37.664	82.222	21.884
3	50 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.610	12.611	12.612	12.363	12.364
				9.852	30.596	48.966	27.265	60.935
4	25 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.613	12.614	12.366	12.367	12.368
				12.182	10.279	3.349	41.821	42.470
5	12,5 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.370	12.371	12.372	12.373	12.374
				656	5.433	213	5.354	3.835
6	6,2 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.375	12.377	1.239	12.615	12.616
				659	34	1.578	24	222
10	25 μg	Líquido	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
			<10	12.395 21.679	12.396 18.972	12.397 36.749	12.398 24.148	12.399 28.259

Tabla 9.

Grupo	Dosis de LT	Forma del Antígeno		IgG sérica anti-DT (unidades de ELISA)				
1	200 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.350	12.351	12.352	12.353	12.354
				3.176	9.920	35.802	41.296	37.318
2	100 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.355	12.356	12.357	12.358	12.359
				56.490	3.668	47.103	51.026	1.276
3	50 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.610	12.611	12.612	12.363	12.364
				5.526	8.576	69.200	28.790	4.269
4	25 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.613	12.614	12.366	12.367	12.368
				26.624	49.297	23.119	5.544	10.882
5	12,5 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.370	12.371	12.372	12.373	12.374
				33.467	15.225	801	32.369	2.649
6	6,2 μg	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.375	12.377	1.239	12.615	12.616
				23.269	2.902	10.924	18	7.341
10	25 μg	Líquido	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
			<10	12.395	12.396	12.397	12.398	12.399
				56.346	26.444	72.928	65.058	10.800

Ejemplo 7. Respuestas de IgG sérica específicas de antígeno después de la inmunización transcutánea con cantidades constantes de enterotoxina sensible al calor (LT) y toxoide de la difteria (DT) en parches de tamaño decreciente. Se inmunizaron ratones C57BL/6 (cinco por grupo) en la piel con 25 μg de LT y 100 μg de DT en formulaciones secas o líquidas.

Brevemente, se afeitaron los lomos de los ratones desde el aspecto distal del omóplato hasta 0,5 cm por encima de la base de la cola 48 horas antes de la inmunización. En el día de la inmunización, los ratones se inmovilizaron por inyección de 30 μl de una mezcla de anestesia dando lugar a una dosis final de aproximadamente 83 mg/kg de ketamina y 8,3 mg/kg de xilazina. El lomo de cada ratón se hidrató pasando 10 veces una almohadilla de gasa saturada con agua. Se dejó una cantidad de agua en el lomo durante aproximadamente 5 minutos. El exceso de agua se secó con una almohadilla de gasa seca antes de aplicar el antígeno. Grupos 1-5, las disoluciones de antígeno se mezclaron 48-72 horas antes de la inmunización. Grupo 6, el antígeno se preparó en el día de la inmunización.

Para los grupos que recibieron parches, se cortó un trozo de 1,25 cm por 2,5 cm de celofán de material disponible comercialmente. Se cortaron trozos de papel de seda KIMWIPE en una serie de áreas superficiales más pequeñas para permitir una administración más concentrada de la formulación. Las dimensiones de los trozos de papel de seda fueron las siguientes: 1,00 cm^2 (grupo 1), 0,5 cm^2 (grupo 2), 0,25 cm^2 (grupo 3), 0,12 cm^2 (grupo 4) y 0,06 cm^2 (grupo 5). Los trozos cortados se pusieron en el soporte de celofán. Todos los grupos recibieron una dosis constante de los ingredientes activos, 25 μg de LT y 100 μg de DT, que se puso en el parche de papel de seda/celofán en concentraciones crecientes para tener en cuenta el área superficial decreciente del parche. Los volúmenes por parche por ratón fueron los siguientes: 50 μl (grupo 1), 25 μl (grupo 2), 12,5 μl (grupo 3), 6,3 μl (grupo 4) y 3,1 μl (grupo 5). La disolución de antígeno se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche. Para el grupo 6, se puso un volumen de 50 μl de disolución directamente en la piel del ratón. En todos los grupos la formulación se aplicó durante 30 minutos tras lo cual la formulación remanente se eliminó lavando la superficie del sitio de la inmunización con cantidades copiosas de agua.

El suero se recogió antes de cualquier exposición a antígeno/adyuvante (es decir, sangre antes de la inmunización) y cuatro semanas después de la tercera inmunización. Se evaluaron las titulaciones de anticuerpo específico de antígeno por un ELISA en fase sólida usando antígeno LT o DT como la proteína de recubrimiento. Las muestras se diluyeron de manera seriada empezando en 1:100 en diluyente.

Después de la inmunización, los animales de los grupos de la formulación sólida y líquida desarrollaron titulaciones elevadas de IgG anti-LT (Tabla 10) y anti-DT (Tabla 11) comparadas con las titulaciones observadas en las muestras de sangre antes de la inmunización. Los resultados se muestran en unidades de ELISA, la dilución inversa a la que la DO 405 nm es 1,0. Conjuntamente, estos resultados indican que las formulaciones secas y liofilizadas de antígeno/adyuvante pueden usarse para administrar el antígeno a través de la piel durante la inmunización epicutánea y que el antígeno seco puede aplicarse en áreas superficiales pequeñas y aún así rendir respuestas inmunes significativas.

Tabla 10.

Grupo	Área Superficial del Parche	Forma del Antígeno		IgG sérica anti-LT (unidades de ELISA)				
1	1,00 cm^2	Secada en papel de seda Soporte de celofán	Sangre antes de la inmunización medio <10	Etiqueta en la oreja# 12.310 276	 12.311 4.252	 12.312 14.914	 12.313 4.076	 12.314 18.496
2	0,50 cm^2	Secada en papel de seda Soporte de celofán	Sangre antes de la inmunización medio <10	Etiqueta en la oreja# 12.315 6.980	 12.316 13.057	 12.317 678	 12.318 5.266	 12.319 10.352
3	0,25 cm^2	Secada en papel de seda Soporte de celofán	Sangre antes de la inmunización medio <10	Etiqueta en la oreja# 12.321 39.141	 12.322 16.677	 12.323 2.214	 12.609 9.680	
4	0,13 cm^2	Secada en papel de seda Soporte de celofán	Sangre antes de la inmunización medio <10	Etiqueta en la oreja# 12.324 6.200	 12.325 2.932	 12.326 3.288	 12.327 13.112	 12.329 2.859
5	0,06 cm^2	Secada en papel de seda Soporte de celofán	Sangre antes de la inmunización medio <10	Etiqueta en la oreja# 12.330 1.508	 12.331 1.311	 12.332 2.072	 12.333 1.499	 12.334 2.573
6	1,00 cm^2	Líquida	Sangre antes de la inmunización medio <10	Etiqueta en la oreja# 12.335 14.984	 12.336 7.403	 12.337 3.663	 12.338 42.290	 12.339 56.274

Tabla 11.

Grupo	Área Superficial del Parche	Forma del Antígeno		IgG sérica anti-DT (unidades de ELISA)				
1	1,00 cm^2	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.310	12.311	12.312	12.313	12.314
				3.389	2.259	3.638	5.551	7.747
2	0,50 cm^2	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.315	12.316	12.317	12.318	12.319
				71.236	68.949	6.169	18.233	67.872
3	0,25 cm^2	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.321	12.322	12.323	12.609	
				11.771	33.543	12.415	12.648	
4	0,13 cm^2	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.324	12.325	12.326	12.327	12.329
				75.433	155	8.997	28.730	7.667
5	0,06 cm^2	Secada en papel de seda	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
		Soporte de celofán	<10	12.330	12.331	12.332	12.333	12.334
				4.814	2.122	471	13.511	89
6	1,00 cm^2	Líquida	Sangre antes de la inmunización medio	Etiqueta en la oreja#				
			<10	12.335	12.336	12.337	12.338	12.339
				38.885	22.697	24.334	45.101	34.333

Los ejemplos anteriores demuestran la ventaja de usar una formulación seca y varias formas físicas de ésta en la inmunización transcutánea. Debe indicarse, sin embargo, que los procesos implicados en conseguir la inmunización transcutánea como se muestra en nuestras publicaciones (Glenn et al., 1998ab; 1999); Pat. U.S. Nos. 5.910.306 y 5.980.898; WO 98/20734 y WO 99/43350; y Solic. U.S. Nos. 09/257.188; 09/309.881; 09/311.720; 09/316.069; y 09/337.746 podrían adaptarse en el contexto de la invención.

REFERENCIAS

Alving and Wassef (1994) AIDS Res. Hum. Retro., 10 (sup l. 2):S91-S94.

Antel et al. (1996) Nature Medicine, 2:1074-1075.

Ausubel et al. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, Nueva York.

Ball et al. (1998) J. Virol., 72:1345-1353.

Bathurst et al. (1993) Vaccine, 11:449-456.

Bieber (1997) Intl. Arch. Allergy Immunol., 113:30-34.

Black et al. (1979) *Report and immunogenicity of Wellcome cholera toxoids in Bangladeshi volunteers*, Bangladesh, Informe Cientifico No. 29, Dacca.

Blum (1995) Digestion, 56:85-95.

Bodanszky (1993) *Peptide Chemistry*. Springer-Verlag, Nueva York.

Bos (1997) Clin. Exp. Immunol., 107 (suppl. 1):3-5.

Burnette et al. (1994) En: *Bioprocess Technology*, (Burnette et al.), p. 185-203.

Celluzzi and Falo (1997) J. Invest. Dermatol., 108:716-720.

Chang et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6343-6347.

Chang et al. (1992) J. Immunol., 139:548-555.

Chang et al. (1994) J. Immunol., 152:3483-3490.

Chen et al. (1998) Infect. Immun., 66:1648-1653.

Clements y Finkelstein (1979) Infect. Immunol., 24:760-769.

Craig (1965) En: *Proceedings of the Cholera Research Symposium*, Honolulu, US Public Health Service Publication No. 1328, pp. 153-158.

Craig (1966) J. Bact., 92: 793-795.

Curlin et al. (1975) En: *Proceedings of the 11th Joint Conference on Cholera*. U.S. Japan Cooperative Medical Science Program.

Dahl (1996) En: *Clinical Immunodermatology*, 3rd Ed. Mosby, St. Louis, p. 345-352.

Delenda et al. (1994) J. Gen. Virol., 75:1569-1578.

Deprez et al. (1996) Vaccine, 14:375-382.

Deutscher (1990) *Guide to Protein Purification*. Academic Press, San Diego.

Dickenson y Clements (1995) Infect. Immun., 63:1617-1623.

Douce et al. (1997) Infect. Immun., 65:28221-282218.

Dragunsky et al. (1992) Vaccine, 10:735-736.

Elson y Dertzbaugh (1994) En: *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, p. 391.

Finkelstein y LoSpallutto (1969) J. Exp. Med., 130:185-202.

Fonseca et al. (1994) Vaccine, 12:279-285.

Frankenburg et al. (1996) Vaccine, 14:923-929.

Fries et al. (1992a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:358-362.

Fries et al. (1992b) Infect. Immun., 60:1834-1839.

Fujita y Finkelstein (1972) J Infect Dis, 125:647-655.

Glenn et al. (1995) Immunol. Lett., 47:73-78.

Glenn et al. (1998a) Nature, 393:851.

Glenn et al. (1998b) J. Immunol., 161:3211-3214, 1998

Glenn et al. (1999) Infect. Immun., 67:1100-1106.

Goeddel (1990) *Gene Expression Technology*. Academic Press, San Diego.

Gregoriadis (1993) *Liposome Preparation and Related Techniques*, 2a Ed. CRC Press, Boca Raton.

Hanson y Roun (1992) En: *Stability of Protein Pharmaceuticals,* Vol. 3, Plenum Press, Nueva York, p. 209-233.

Herrington et al. (1991) Am. J. Trop. Med. Hyg., 45:695-701.

Herz et al. (1998) Intl. Arch. Allergy Immunol., 115:179-190.

Holmgren et al. (1975) Infect. Immun., 12: 463-470.

Howell y Miller (1983) J. Clin. Microbiol., 18:658-662.

Jahrling et al. (1996) Arch. Virol. Suppl., 11:135-140.

Janeway y Travers (1996). *Immunobiology*. Churchill Livingstone, Nueva York.

Janson y Ryden (1997) *Protein Purification*, 2a Ed. Wiley, Nueva York.

Jackson et al. (1993) Infec. Immun., 61:4272-4279.

John et al. (1996) Dev. Biol. Stand., 87:19-25.

Katkov (1996) Med. Clin. North Am., 80:189-200.

Khusmith et al. (1991) Science, 252:715-718.

Kleinau et al. (1994) Clin. Exp. Immunol., 96:281-284.

Kounnas et al. (1992) J. Biol. Chem., 267:12420-12423.

Kreig et al. (1995) Nature, 374:546.

Kriegler (1990) *Gene Transfer and Expression*. Stockton Press, Nueva York.

Kripke et al. (1987) J. Immunol., 145:2833-2838.

Krueger y Barbieri (1995) Clin. Microbiol. Rev., 8:34-47.

Lee y Chen (1994) Infect. Immun., 62:3594-3597.

Leung (1995) J. Invest. Dermatol., 105 (Supl. 1):37S-42S.

Leung (1997) Clin. Exp. Immunol., 107 (Supl. 1):25-30.

Lange et al. (1979) Infect. Immun., 23:743-750.

Lieberman y Greenberg (1996) Adv. Pediatr. Infect. Dis., 11:333-363.

Lu et al. (1997) Vaccine Res., 6:1-13.

Malik et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3300-3304.

Mast y Krawczynski (1996) Annu. Rev. Med., 47:257-266.

Mekalanos et al. (1979) J. Biol. Chem., 254:5855-5861.

Medzhitov y Janeway (1997) Curr. Opin. Immunol., 9:4-9.

Merson et al. (1980) Lancet, i:9312-932.

Migliorini et al. (1993) Eur. J. Immunol., 23:582-585.

Morein y Simons (1985) Vaccine, 3:83-93.

Moschella (1996) *Cutaneous Medicine and Surgery*. W.B. Saunders, Filadelfia.

Moschella y Hurley (1992) *Dermatology*, 3a Ed. Harcourt Brace Janovitch, Filadelfia.

Munoz et al. (1990) J. Exp. Med., 172:95-103.

Murphy et al. (1998) Cutan. Pathol., 25:30-34.

Murray (1991) *Gene Transfer and Expression Protocols*. Humana Press, Clifton, NJ.

Nashar et al. (1997) Immunology, 91:572-578.

Nohria y Rubin (1994) Biotherapy, 7:261-269.

Northrup y Chisari (1972) J. Infect. Dis., 125:471-479.

Paul y Cevc (1995) Vaccine Res., 3:145-164.

Paul et al. (1995) Eur. J. Immunol., 25:3521-3524.

Pessi et al. (1991) Eur. J. Immunol., 24:2273-2276.

Peterson (1979) Infect. Immun., 26:594-598.

Pierce and Reynolds (1974) J. Immunol., 113:1017-11023.

Pierce y Reynolds (1978) J. Exp. Med., 148:195-206.

Pierce et al. (1976) Infect. Immun., 13:735-740.

Pierce et al. (1977) J. Infect. Dis., 135:888-896.

Pierce et al. (1978) Infect. Immun., 21:185-193.

Pierce et al. (1980) Infect. Immun., 27:632-637.

Pierce et al. (1983) Infect. Immun., 37I: 687-694.

Plotkin y Mortimer (1994) *Vaccines*, 2a Ed. W.B. Saunders, Filadelfia.

Ramiya et al. (1996) J. Autoimmun., 9:349-356.

Rappaport et al. (1976) Infect. Immun., 14:687-693.

Rappuoli et al. (1995) Intl. Archiv. Allergy Immunol., 108:327-333.

Rappuoli et al. (1996) Adv. Exp. Med. Biol., 397:55-60.

Ribi et al. (1988) Science, 239:1272-1276.

Richards et al. (1995) En: *Vaccine Design*, Plenum, Nueva York.

Rietschel et al. (1994) FASEB J., 8:217-225.

Roberts y Walker (1993) In: *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*. Marcel Dekker, Nueva York.

Saloga et al. (1996a) J. Invest. Dermatol., 106:982-988.

Saloga et al. (1996b) Exp. Dermatol., 5:65-71.

Sanchez et al. (1999) Intl. J. Pharm., 185:255-266.

Sasaki et al. (1998) Clin. Exp. Immunol., 111:30-35.

Saukkonen et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:118-122.

Schneerson et al. (1996) Lancet, 348:1289-1292.

Scopes (1993) *Protein Purification*. Springer-Verlag, Nueva York.

Seder y Paul (1994) Annu. Rev. Immunol., 12:635-673.

Shafara et al. (1995) Ann. Intern. Med., 125:658-668.

Skeiky et al. (1995) J. Exp. Med., 181:1527-1537.

Smedile et al. (1994) Prog. Liver Dis., 12:157-175.

Smucny et al. (1995) Am. J. Trop. Med. Hyg., 53:432-437.

Sniderman (1995) Crit. Rev. Immunol., 15:317-348.

Spangler (1992) Microbiol. Rev., 56:622-647.

Stacey et al. (1996) J. Immunol., 157:2116-2122.

Stoute et al. (1997) New Engl. J. Med., 336:86-91.

Summers y Smith (1987) *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedure*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, No. 1555.

Svennerholm et al. (1978) Infect. Immun., 211-6.

Svennerholm et al. (1984) Bull. WHO, 62:909-918.

Svennerholm et al. (1982) Lancet, i:305-308.

Tam (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5409-5413.

Trach et al. (1997) Lancet, 349:231-235.

Udey (1997) Clin. Exp. Immunol., 107 (Sup l. 1):6-8.

Vajdy et al. (1995) J. Exp. Med., 181:41-53.

van Heyningen y Seal (1983) *Cholera: The American Scientific Experience, 1947-1980.* Westview Press, Boulder, Colorado.

Vandenbark et al. (1996) Nature Medicine, 2:1109-1115.

Vosika et al. (1984) Cancer Immunol. Immunother., 18:107-112.

Vreden et al. (1991) Am. J. Trop. Med. Hyg., 45:533-538.

Walters y Hadgraft (1993) *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*, Marcel Dekker, Nueva York.

Wang et al. (1995) J. Immunol., 154:2784-2793.

Wang et al. (1996) J. Immunol., 156:4079-4082.

White et al. (1993) Vaccine, 11:1341-1346.

Wiedermann et al. (1998) Clin. Exp. Immunol., 111:144-151.

Wiesmueller et al. (1991) Immunology, 72:109-113.

Wisdom (1994) *Peptide Antigens*. IRL Press, Oxford.

Zepter et al. (1997) J. Immunol., 159:6203-6208.

Zhang et al. (1995) Infect. Immun., 63:1349-1355.

REIVINDICACIONES

1. Formulación para la inmunización transcutánea que comprende un antígeno en forma seca y un adyuvante en forma seca, y por la cual la aplicación de la formulación en la piel intacta, sin perforar ésta, induce una respuesta inmune específica para el antígeno, en la que dicho adyuvante comprende una exotoxina bacteriana que ADP-ribosila o una subunidad de ésta que se une al gangliósido GM1.

2. Formulación según la reivindicación 1, en la que dicho antígeno tiene un peso molecular mayor de 500 daltons.

3. Formulación según la reivindicación 1, en la que dicho antígeno se obtiene de un patógeno seleccionado del grupo que consiste en bacteria, virus, hongo y parásito.

4. Formulación según la reivindicación 3, en la que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en: Bacillus anthracis, Campylobacter, Vibrio cholerae, Clostridia incluyendo clostridium difficile, difteria, E: coli enterohemorrágica, E. coli enterotoxigénica, Giardia, gonococcus, Helicobacter pylori o ureasa producida por H. pylori, Hemophilus influenza B, Hemophilus influenza no tipificable, Legionella, meningococcus, Mycobacterium incluyendo aquellos organismos responsables de la tuberculosis, pertussis, pneumococcus, Salmonella, Shigella, Staphylococcus y sus enterotoxinas, streptococcus beta hemolíticos grupo A, Streptococcus B, tétanos, Borrelia burgdorfi y Yersinia.

5. Formulación según la reivindicación 3, en la que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en: adenovirus, dengue serotipos 1 a 4, ébola, enterovirus, virus hanta, hepatitis serotipos A a E, virus del herpes simple 1 ó 2, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano, influenza, sarampión, Norwalk, encefalitis equina japonesa, virus del papiloma, parvovirus B19, polio, rabia, virus respiratorio sincitial, rotavirus, rubéola, sarampión, encefalitis de St. Louis, vaccinia, vectores de expresión virales que contienen genes que codifican otros antígenos tales como los antígenos de la malaria, varicela y fiebre amarilla.

6. Formulación según la reivindicación 1, en la que dicho antígeno es un antígeno tumoral o un autoantígeno.

7. Formulación según la reivindicación 1, en la que dicho antígeno se selecciona del grupo que consiste en carbohidrato, glicolípido, glicoproteína, lípido, lipoproteína, fosfolípido y polipéptido.

8. Formulación según la reivindicación 1, en la que la formulación está comprendida por un virus vivo atenuado y al menos un antígeno es expresado por el virus vivo atenuado.

9. Formulación según la reivindicación 1, en la que dicho antígeno es un polipéptido de más de 500 daltons de peso molecular.

10. Formulación según la reivindicación 1, en la que dicho antígeno es multivalente.

11. Formulación según la reivindicación 1, en la que una única molécula es tanto un adyuvante como un antígeno de la formulación.

12. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 ó 9-11, en la que la formulación no incluye un potenciador de la penetración, partícula viral, liposoma o lípido cargado.

13. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la formulación sí incluye un potenciador químico de la penetración que incremente la eficacia de la inmunización en comparación con el uso de una formulación que carece del potenciador químico de la penetración.

14. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, por la cual la exposición de la piel intacta al adyuvante activa una célula de Langerhans subyacente.

15. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, por la cual la exposición de la piel intacta al adyuvante causa que una célula de Langerhans subyacente incremente la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.

16. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, por la cual la exposición de la piel intacta al adyuvante causa la migración de una célula de Langerhans subyacente a un ganglio linfático.

17. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, por la cual la exposición de la piel intacta al adyuvante produce una señal para una célula de Langerhans subyacente para madurar en una célula presentadora de antígeno.

18. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, por la cual la exposición de la piel intacta al adyuvante incrementa la presentación del antígeno a los linfocitos.

19. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un excipiente, estabilizador, desecante o conservante.

20. Formulación según la reivindicación 19, que comprende un conservante o estabilizador seleccionado del grupo que consiste en: sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, dextrano y glicerina.

21. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20 que comprende además un apósito y se proporciona de esta manera una forma de parche de la formulación.

22. Formulación según la reivindicación 21, en la que el apósito es un apósito oclusivo.

23. Formulación según la reivindicación 21, en la que la piel intacta cubierta por el apósito tiene un área superficial que es mayor que al menos un campo de ganglios linfáticos de drenaje.

24. La formulación seca según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la inmunización transcutánea aplicando la formulación en la piel intacta de un sujeto sin perforar ésta, y que comprende la penetración potenciada de al menos un antígeno o adyuvante a través de la piel con al menos un potenciador físico o químico de la penetración aplicado en la piel antes, después y/o durante la aplicación de la formulación en la piel.

25. La formulación seca de la reivindicación 24, que comprende aplicar alcohol en, o hidratar, la piel intacta antes de la aplicación de la formulación.

26. Un método para producir una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 para la inmunización transcutánea que comprende:

(a) proporcionar al menos un antígeno y al menos un adyuvante;

(b) disolver al menos el antígeno y adyuvante para producir un líquido inmunológicamente activo;

(c) secar el líquido inmunológicamente activo en un sustrato sólido para producir la formulación;

(d) en el que al menos el antígeno y adyuvante están en forma seca al menos hasta que la formulación se aplica en la piel de un sujeto que se va a inmunizar y en el que el adyuvante comprende una exotoxina bacteriana que ADP-ribosila o una subunidad de ésta que se une al gangliósido GM1.

27. Un método según la reivindicación 26, que comprende además mezclar todos los ingredientes activos juntos para producir una formulación homogénea.

28. Un método según la reivindicación 26 ó 27, en el que la formulación está comprendida esencialmente por un ingrediente inmunológicamente activo.

29. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en el que el sustrato sólido es un apósito y la formulación se proporciona de esta manera como un parche.

30. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 26-29, en el que la formulación se produce bajo condiciones asépticas adecuadas para la producción de una vacuna.

31. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 26-30, en el que una única aplicación de la formulación es suficiente para inducir una respuesta inmune específica de antígeno detectable.

32. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 26-31, en el que la formulación está comprendida además por al menos un excipiente, estabilizador, desecante o conservante.

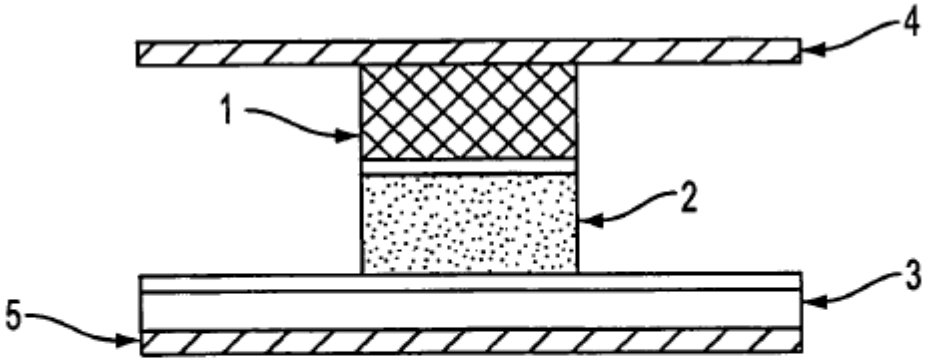

FIG. 1