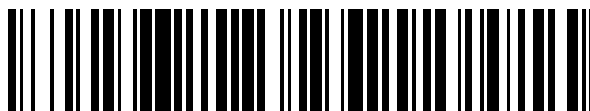


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 516**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06795406 .5**
96 Fecha de presentación: **23.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1898949**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **VACUNACIÓN POR DIRECCIONAMIENTO ESPECÍFICO TRANSCUTÁNEO.**

30 Prioridad:
23.06.2005 FR 0506412

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.04.2012

73 Titular/es:
**FONDATION BETTENCOURT-SCHUELLER
16 PLACE VENDOME
75001 PARIS, FR;
UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS
VI) y
UNIVERSITE CHARITE-UNIVERSITÄTSMEDIZIN
BERLIN**

72 Inventor/es:
**COMBADIÈRE, Behazine;
VOGT, Annika;
BLUME-PEYTAVI, Ulrike;
AUTRAN, Brigitte;
KATLAMA, Christine y
SCHAEFFER, Hans**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 378 516 T3

DESCRIPCIÓN

Vacunación por direccionamiento específico transcutáneo

La presente invención se refiere a un método de vacunación a través de los folículos pilosos que hace posible dirigir específicamente los componentes de la vacuna hacia las células presentadoras de antígenos para inducir una respuesta inmunitaria protectora y eficaz contra los patógenos.

La vacunación es un medio eficaz para prevenir o reducir las infecciones virales o bacterianas. El éxito de las campañas de vacunación en estos campos ha hecho posible ampliar el concepto de vacuna, hasta ahora utilizado en el campo de la infectología, a los campos del cáncer y las enfermedades autoinmunitarias.

La vacunación a través de las vías "convencionales": intramuscular, intradérmica en disolución, tiene muchas limitaciones cuando se pone en práctica. Las técnicas de vacunación convencionales, de hecho, tienen las desventajas de requerir el uso de agujas y, por la misma razón, de provocar problemas de esterilidad y heridas, y también son problemáticas en cuanto a la inestabilidad de las vacunas tras la reconstitución en disolución, y en el caso del incumplimiento de la cadena de frío durante el almacenamiento y transporte de las mismas.

Además, la preparación de vacuna debe alcanzar posteriormente los órganos linfoides secundarios, que son los lugares de respuesta inmunitaria. Durante el camino de la preparación de vacuna hacia estos órganos, el antígeno de la preparación se puede diluir en los fluidos corporales, se puede retener en tejidos que no son competentes para la respuesta inmunitaria esperada, o se pueden degradar, lo que conduce a pérdidas considerables de la preparación de vacuna inyectada inicialmente. Por lo tanto, las cantidades de vacunas inyectadas deben ser considerables para compensar estas pérdidas.

La piel es un órgano especialmente rico en células presentadoras de antígenos, y estas células son absolutamente necesarias para la inducción de respuestas vacunales potentes y eficaces. Su localización y su función se han estudiado y se conocen especialmente bien.

Durante mucho tiempo se ha sabido, de hecho, que se puede inducir una respuesta inmunitaria eficaz e intensa tras la degradación de la barrera cutánea, tal como la escarificación en el caso de la viruela en seres humanos, por ejemplo. Sin embargo, los estudios demuestran que la vacunación con ADN plasmídico desnudo que codifica un antígeno superficial de hepatitis B en disolución acuosa sobre la piel intacta de ratón también produce respuestas inmunitarias específicas e intensas (Fan 1999).

Recientemente se ha demostrado que es posible inducir respuestas inmunitarias en ratones tras aplicaciones tópicas de vacunas en la piel de estos animales, desprovista con antelación de queratinocitos (Ishii N, *et al.*, (2001) *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* Nov 6(1) págs. 76-80). De forma similar, ha sido posible inducir una respuesta al ADN del virus VIH en monos infectados con este virus (Lisziewicz J., *et al.* 9ª Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas. Seattle, Febrero de 2002). Se han llevado a cabo estudios tras la vacunación de monos con partículas de 0,1 µm de diámetro que consistían en polietilenimina y manosa revestidas con ADN. Fue necesaria un área superficial de al menos 40 cm² de la piel de los monos para llevar a cabo este experimento. Una estimación preliminar determina en un 1% el número de células de Langerhans (células presentadoras de antígenos) que expresan el ADN introducido (Derma-vir) (Lisziewicz, J., *et al.*, (2005) *J. Invest. Dermatol.*, Enero 124 (1), págs. 160-9).

Estos estudios demostraron así que la vacunación transcutánea en modelos animales hace posible inducir una respuesta inmunitaria eficaz. Los métodos de vacunación transcutánea disponibles hasta la fecha implican, sin embargo, procedimientos de preparación de la vacuna que a menudo son complejos, y un método de administración que la mayoría de las veces es invasivo (afeitado, escarificación, abrasión de las capas superiores de la epidermis, etc.) asociado al uso de una gran área superficial de la piel del paciente. Además, no se tiene en cuenta en absoluto el riesgo de pérdida del producto a través del torrente sanguíneo.

La absorción percutánea de compuestos aplicados en la piel intacta está limitada, de hecho, por la capa córnea, que forma una barrera muy estructurada en la superficie de la piel, lo que explica la necesidad hasta ahora de alterar esta capa córnea mediante métodos físicos. El paso de moléculas a través de la capa córnea de la piel tiene lugar a una velocidad de difusión muy baja, y las moléculas más grandes, de las cuales las proteínas son una parte, consiguen atravesar esta barrera con gran dificultad.

Se sabe, sin embargo, por las Patentes US 5.910.306 y US 5.980.898 (Ejército de EE.UU.) que también se puede aplicar en seres humanos una aproximación de la aplicación transcutánea de vacunas. De hecho, los autores de la patente US 5.980.898 han inducido, por ejemplo, una respuesta inmunitaria intensa tras una inmunización transcutánea de una enterotoxina lábil de la bacteria *E. coli* mediante el uso de un sistema de parches. Sin embargo, la desventaja de esta aproximación es que requiere la aplicación de la preparación de vacuna sobre una gran área superficial de la piel del individuo.

En condiciones fisiológicas, las concentraciones de los productos activos aplicados de manera tópica son bajas, en particular si se formulan en forma de preparaciones farmacéuticas diluidas. Esto se debe en parte al hecho de que las preparaciones convencionales de compuestos activos en disolución se dispersan en la superficie de la piel, lo

que da como resultado concentraciones locales bajas del compuesto activo. Además, cuanto menor es la concentración local eficaz, mayor es el riesgo de que estos compuestos activos se unan a las proteínas de la piel de manera inespecífica, lo que reduce aún más la concentración libre disponible para la vacunación.

5 Sobre todo, debido a que la epidermis se está renovando continuamente, los compuestos activos unidos se pierden inevitablemente durante esta renovación.

Los elementos de la piel, sin embargo, y en particular los folículos pilosos, son sitios de discontinuidad que son importantes en la función como barrera de la piel.

10 Diversos estudios han demostrado que los folículos pilosos son, a pesar de su pequeño tamaño en comparación con el de la epidermis entre dos folículos, una vía de acceso predominante para la absorción percutánea de material exógeno, lo que incluye compuestos activos (Hueber 1994, Tenjarla 1999). Además, la inserción de folículos pilosos en una piel modificada incrementa la tasa de penetración de hidrocortisona (Michel 1999).

El solicitante ha desarrollado un método de vacunación a través de los folículos pilosos que hace posible dirigir específicamente los componentes de la preparación de vacuna hacia las células presentadoras de antígenos para inducir una respuesta inmunitaria protectora y eficaz contra los patógenos.

15 El solicitante ha descubierto así que este método de vacunación dirigida hace posible hacer accesibles para las vacunas las células presentadoras de antígenos profesionales localizadas alrededor de los folículos pilosos. Un objetivo de la invención es, así, un método de vacunación dirigida y también el acceso preferente de los componentes de la preparación de vacuna a las células presentadoras de antígenos.

20 El direccionamiento específico de la vacunación da como resultado concentraciones elevadas de preparación de vacuna en el folículo piloso, cerca de las células presentadoras de antígenos presentes en el folículo, cuyas células, a diferencia de las del espacio interfolicular, son muy accesibles para los compuestos activos aplicados de manera tópica.

25 El solicitante ha descubierto así el uso terapéutico o preventivo de una vacuna optimizada mediante la especialización de la vía de entrada transcutánea de la preparación de vacuna y mediante el direccionamiento específico hacia las células presentadoras de antígenos de la piel (dermis y epidermis), lo que hace posible reducir el área superficial de inoculación de la vacuna.

Un objetivo de la invención, así, es el uso, para una preparación de vacuna, de partículas de un tamaño establecido. De manera específica, estas partículas exhiben una sección transversal que tiene un diámetro de entre 0,1 nm y 0,2 µm.

30 Otro objetivo de la invención es el uso de tales partículas para preparar una composición de vacuna terapéutica.

Otro objetivo de la invención es el uso de tales partículas para preparar una composición de vacuna terapéutica o profiláctica útil en individuos inmunodeprimidos.

Otros objetivos de la invención serán evidentes a la luz de la descripción, de los ejemplos siguientes y de los dibujos adjuntos en el anexo de la presente solicitud.

35 La Figura 1 muestra la penetración desorganizada de las partículas en el caso de la destrucción de la capa epidérmica debido a aplicaciones repetidas de pegamento. Las dos figuras de la parte superior muestran las partículas fluorescentes después de una aplicación de pegamento (flecha). Las dos figuras de la parte inferior muestran la entrada de las partículas fluorescentes después de tres aplicaciones de pegamento.

40 La Figura 2 muestra la penetración profunda de las partículas fluorescentes con un tamaño de 0,04 µm en los folículos pilosos. Los asteriscos representan el tejido adyacente.

La Figura 3 muestra la penetración de partículas de diversos tamaños de 1,5 y de 0,75 µm en la parte superficial de los folículos pilosos.

45 La Figura 4 demuestra, mediante el uso de fluorescencia, la expresión específica del marcador de células de Langerhans CD1a alrededor de los folículos pilosos. La ampliación muestra una célula de Langerhans marcada mediante fluorescencia.

La Figura 5 muestra la penetración de las partículas fluorescentes en las células de Langerhans tras la aplicación transcutánea a 37 °C. Las líneas discontinuas representan los contornos de las células de Langerhans.

50 La Figura 6 muestra la medida de la respuesta T inmunitaria específica con la vacuna TETAGRIP® (Aventis Pasteur) en un modelo murino de vacunación transcutánea. Las respuestas de células específicas del antígeno inducidas mediante la vacunación se determinan *ex vivo* mediante la técnica EliSpot con el uso de células de sangre periférica en diversos momentos tras la vacunación. Los cuadrados negros representan las respuestas T inmunitarias eficaces tras la inmunización transcutánea con la vacuna humana TETAGRIP® (n=11), y los círculos claros representan el

control negativo (n=6).

La Figura 7 muestra la medida de la respuesta T proliferativa específica con la vacuna TETAGRIP en un modelo murino de vacunación transcutánea.

- 5 La Figura 8 muestra la medida de la respuesta humoral específica con la vacuna TETAGRIP en un modelo murino de vacunación transcutánea. El N° 1 corresponde a una administración de control de PBS (n=5), el N° 2 corresponde a la proteína OVA (n=6), el N° 3 corresponde a la proteína OVA con toxina del cólera marcada con FITC (n=7), y el N° 4 corresponde al ADN plasmídico de OVA.

La Figura 9A muestra la localización de las partículas fluorescentes en un modelo de vacunación transcutánea a diversas profundidades 5 horas tras la inmunización.

- 10 La Figura 9B es el control negativo a diversas profundidades en ausencia de partículas 5 horas tras la inmunización.

La Figura 10A muestra la localización de las partículas fluorescentes en un modelo de vacunación transcutánea mediante el uso de una sonda para observar la fluorescencia a diversas profundidades 24 horas tras la inmunización y la difusión de esta fluorescencia en el área alrededor del folículo piloso.

- 15 La Figura 10B es el control negativo con una sonda para la observación a diversas profundidades en ausencia de partículas 24 horas tras la inmunización.

La Figura 11 muestra la localización de las partículas en los nódulos linfáticos tras la vacunación transcutánea. A: nódulo de control, B: nódulo inguinal, C: nódulo axial.

- 20 La Figura 12 muestra la medida de la respuesta T protectora específica con la vacuna TETAGRIP en un modelo murino de vacunación transcutánea en función del tiempo. Los círculos claros simbolizan los ratones que han recibido las células EL-4 sin antígeno (n=4), y los círculos negros simbolizan los ratones que han sido vacunados con las células EG-7 (n=4).

- 25 La Figura 13 muestra las frecuencias de los linfocitos T efectores específicos de la gripe. Los ensayos Elispot se llevaron a cabo en muestras de sangre periférica en los días 0, 14 y 28. La respuesta de células T efectoras se mide mediante la técnica IFN γ -ELISPOT y se compara entre los grupos transcutáneo e intramuscular mediante el uso de la prueba de Mann-Witney, *ns*= no significativo, valor *p* >0,05 (*prueba de Mann-Witney*). IQR = intervalo inter-cuartil.

- 30 La Figura 14A muestra la respuesta de las células T efectoras tras la inmunización transcutánea. Los símbolos oscuros representan un área superficial de 16 cm²; los círculos simbolizan el voluntario 1, los triángulos que apuntan hacia arriba simbolizan el voluntario 4, los triángulos que apuntan hacia abajo simbolizan el voluntario 6 y los rombos simbolizan el voluntario 7. Los símbolos claros representan un área superficial de aplicación de 32 cm². Las líneas continuas simbolizan el voluntario 2, los rectángulos simbolizan el voluntario 3 y los triángulos simbolizan el voluntario 5.

- 35 La Figura 14B representa la respuesta de las células T efectoras tras la inmunización con una inyección intramuscular. Los cuadrados sombreados representan el voluntario 8, los triángulos que apuntan hacia arriba representan el voluntario 9, los triángulos que apuntan hacia abajo representan el voluntario 10 y los rombos representan el voluntario 11. La respuesta de células T efectoras se mide mediante la técnica IFN γ -ELISPOT.

- 40 Las Figuras 15A y 15B representan las frecuencias respectivas de los linfocitos T efectores específicos de la gripe mediante un ensayo ELISPOT tras la administración transcutánea o intramuscular (Figura 15A, células T CD4, Figura 15B, células T CD8). La evolución entre el día 14 y el valor basal (o el día 28 y el valor basal) se comparó entre los grupos transcutáneo e intramuscular mediante el uso de la prueba de Mann-Witney, *ns*= no significativo, valor de *p* >0,05 (*prueba de Mann-Witney*).

- La Figura 16 representa la producción de IFN γ intracitoplásmica mediante un ensayo de citometría de flujo en células T CD4 y CD8 después de 16 h de estimulación con la vacuna Aggripal® (dilución 1/1000). Los resultados son representativos de células CD4 o CD8 específicas de la gripe que producen IFN γ en diferentes momentos tras la vacunación transcutánea.

- 45 El uso de esta preparación de vacuna según la invención comprende las etapas siguientes:

- a) Pretratamiento de la piel para mejorar la apertura de los folículos pilosos mediante la ablación de como máximo un 50% de la capa córnea.
- b) El uso, para preparar esta preparación de vacuna, de partículas que exhiben una sección transversal que tiene un diámetro de entre 0,1 μ m y 0,2 μ m.
- 50 c) La entrada específica de esta preparación de vacuna a través de los folículos pilosos, y el tamaño pequeño de las partículas permite su difusión a través del epitelio del folículo piloso.

d) La inducción, estimulación o aumento de las respuestas inmunitarias y celulares protectoras.

El direccionamiento específico de los compuestos activos directamente hacia el corazón de los folículos pilosos se lleva a cabo por medio de partículas de un tamaño establecido. De hecho, se sabía que las microesferas que tienen un tamaño del orden de 3 a 10 μm aplicadas de manera tópica a piel humana se agregan a nivel de los orificios foliculares, mientras las microesferas que tienen un tamaño mayor de 10 μm permanecen en la superficie de la piel (Rolland 1993).

Sin embargo, las microesferas o los cristales que tienen un tamaño de hasta unos cuantos micrómetros se pueden introducir, de hecho, en el conducto folicular.

Así, aunque las disoluciones se dispersen en la superficie de la piel de manera inespecífica, Toll y su equipo han demostrado que las microesferas se agregan en los orificios foliculares en función de su tamaño. Específicamente, observaron una penetración preferente de partículas que tenían un tamaño de 1,5 a 6 μm de diámetro en el conducto folicular de folículos pilosos de cuero cabelludo humano, pero las partículas de estos tamaños no penetran, sin embargo, en el epitelio (Vogt, resultados sin publicar).

Sin embargo, las partículas más pequeñas, del orden de 0,2 μm de diámetro, penetran, por otra parte, profundamente en los folículos pilosos. Las partículas de ese tamaño pueden contener o estar revestidas con antígenos, por ejemplo. Estas partículas son capaces de penetrar después en las células de Langerhans epidérmicas en condiciones fisiológicas normales, y permitir la administración de la preparación de vacuna directamente en contacto con las células implicadas.

Las células de Langerhans, que son células dendríticas inmaduras epidérmicas, constituyen, con las células dendríticas localizadas en la dermis, una reserva de células centinela del sistema inmunitario (Kupper T., *et al.*, (2004), *Nat. Rev. Immunol.* 4(3) págs. 211-222). Están estrechamente implicadas en la respuesta inmunitaria a través de la vía intracutánea. Tras su activación, migrarán posteriormente hacia los nódulos linfáticos de drenaje y contribuirán a la respuesta inmunitaria. Las células de Langerhans se concentran alrededor del folículo piloso en seres humanos. Esta propiedad hace de las células de Langerhans objetivos de elección para la administración cutánea de preparaciones antigénicas.

Las partículas según la invención son así partículas que exhiben una sección transversal que tiene un diámetro de entre 0,1 nm y 0,2 μm , tales como, por ejemplo, partículas virales.

Preferiblemente, las partículas según la invención exhiben al menos una sección transversal que tiene un diámetro de entre 0,1 nm y 0,1 μm . Más preferiblemente, estas partículas exhiben al menos una sección transversal que tiene un diámetro de entre 0,1 nm y 0,05 μm .

Al contrario que los métodos descritos anteriormente, el direccionamiento específico de los componentes de la preparación de vacuna hacia los folículos pilosos hace posible aplicar los componentes de esta preparación de vacuna en un área superficial pequeña (menos de 20 cm^2) de la piel. Los componentes de la preparación de vacuna penetran específicamente, gracias a su tamaño, a través de los folículos pilosos y se dirigen esencialmente hacia las células presentadoras de antígenos, que son esenciales en la inducción de una respuesta inmunitaria.

El uso según la invención comprende así la etapa previa de pretratamiento, es decir, de apertura, de los folículos pilosos llevando a cabo una ablación de como máximo el 50% de la capa córnea.

Esta etapa se puede llevar a cabo mediante el uso de tiras adhesivas o "descamación con cinta". De hecho, en la piel sin pelo, alrededor de un tercio de los folículos pilosos están abiertos en condiciones normales. Para mejorar la entrada dirigida de la preparación de vacuna, se usan tiras adhesivas, tales como las de la marca comercial TESA, que no son agresivas para la piel, que permiten la apertura de los folículos pilosos y la retirada de las células muertas de la capa córnea superior (como máximo un 50%) de la piel, mientras al mismo tiempo se conserva la integridad de la piel a nivel epidérmico y dérmico.

Se ha demostrado que la descamación con cinta por sí misma induce la activación de las células presentadoras de antígenos y el mantenimiento de un grupo de células de Langerhans alrededor de los folículos pilosos (J Exp Med 1982).

De manera alternativa, se puede llevar a cabo un tratamiento con un adhesivo o pegamento. Este consiste en la aplicación en la piel de unas cuantas gotas de adhesivo instantáneo (pegamento basado en cianoacrilato), la aplicación de un material de recubrimiento (tira adhesiva, tela, etc.) presionando, y la retirada después de unos cuantos minutos. Esta acción retira la parte superior del folículo cerrado. Este tratamiento hace posible retirar así un 30% del grosor de la capa córnea en cada aplicación de pegamento. Así, es posible retirar hasta un 50% del grosor de la capa córnea sin afectar a la especificidad de la entrada de las partículas al interior del folículo piloso.

Las partículas según la invención contienen el antígeno, es decir, pueden comprender o estar revestidas con el antígeno. Se entiende que las partículas según la invención están revestidas con antígeno o encapsuladas mediante medios conocidos de adsorción y liofilización de manera que no se supera, al menos para una sección transversal,

un diámetro de 0,2 µm para las partículas.

El término "antígeno" pretende significar proteínas, glicoproteínas, péptidos o fracciones de péptidos, polisacáridos, poliósidos, lipopolisacáridos, toxoides, proteínas portadoras conjugadas, extractos celulares, extractos virales, extractos bacterianos, extractos parasitarios, partículas virales, bacterianas o parasitarias vivas, atenuadas, muertas, inactivadas o recombinantes, pseudopartículas virales, ADN, polinucleótidos, ácidos nucleicos recombinantes de patógenos, moléculas implicadas en enfermedades infrecuentes y cánceres, extractos de células cancerosas. El término "antígeno" también pretende significar fragmentos de proteínas completas, con la condición de que estos fragmentos tengan al menos un determinante epitópico inmunógeno.

La cantidad de antígeno en una dosis de preparación de vacuna es la cantidad que induce una respuesta inmunitaria protectora sin efectos secundarios. Tales cantidades varían según el antígeno usado, y se pueden determinar mediante estudios convencionales que incluyen la observación de los títulos de anticuerpo obtenidos en los individuos vacunados. En general, las dosis en un ser humano son de 0,1 a 1000 µg para un antígeno en forma de un ácido nucleico.

De manera alternativa, la preparación de vacuna se puede incorporar en partículas de cera que tienen un punto de fusión de 37 a 40 °C, y se forman partículas o microesferas que tienen un diámetro de entre 0,1 nm y 0,2 µm mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica. Se preparan preparaciones acuosas de estas microesferas de cera por medios conocidos para los expertos en la técnica. Estas partículas de cera se pueden aplicar en la piel del individuo a vacunar. Una vez dentro del folículo piloso, se fundirán en respuesta al calor del mismo, liberando la preparación de vacuna *in situ*.

De manera alternativa, las partículas pueden ser liposomas, lipopéptidos, virosomas o glicoliposomas que incluyen fosfoliposomas.

También se puede hacer uso de nanopartículas poliméricas revestidas o que encapsulan los antígenos de la vacuna y basadas en la polimerización de poliésteres, por ejemplo poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA) o polietilimina (PEI). El uso de nanopartículas que comprenden nanopartículas de poli(ácido láctico) cargadas con péptidos y/o proteínas y/o ADN y/o ácido nucleico también está incluido en la invención.

También están incluidas las microesponjas de tamaños adecuados en las partículas según la invención. Preferiblemente, estas microesponjas son de un color que absorbe el calor. Estas microesponjas se cargan con las preparaciones de vacuna mediante saturación, antes de liofilizarlas. Las microesponjas cargadas se resuspenden posteriormente en un aceite adecuado y se aplican en la piel del paciente a tratar. Así, debido a su tamaño pequeño, estas microesponjas cargadas con la preparación de vacuna penetran profundamente en el conducto folicular. Las microesponjas adecuadas son, por ejemplo, las comercializadas por Cardinal Health Pharmaceutical Technologies & Services, Somerset, NJ, EE.UU.

También se pueden prever las dispersiones de carbón vegetal, de dióxido de titanio, de óxido de zinc, de óxidos de hierro y de talco de un tamaño adecuado. Una vez cargadas con la preparación de vacuna, estas partículas se preparan en vehículos no acuosos tales como aceite, y se usan de la misma manera que las microesponjas. Se puede usar cualquier aceite hidrófobo cosmético o farmacéutico, preferiblemente los aceites de la farmacopea.

Las partículas según la invención también pueden comprender o consistir en ADN desnudo que codifica una parte del genoma del VIH.

Las partículas según la invención incluyen también partículas virales. Preferiblemente, las partículas virales son partículas de VIH inactivadas que pueden ser recombinantes o no. Estas partículas también pueden ser partículas virales de viruela atenuada.

Es posible, para acelerar la liberación de la preparación de vacuna y facilitar su difusión en contacto con las células de Langerhans, calentar moderadamente el área de piel a tratar, por ejemplo por medio de una lámpara roja o infrarroja, de un aparato emisor de microondas o de un dispositivo similar, etc.

Es posible añadir, a la preparación de vacuna a administrar, adyuvantes en forma, por ejemplo, de una emulsión oleosa o de una sustancia grasa tal como vaselina, de citocinas, de quimiocinas, de factores de crecimiento, de derivados de patógenos, de lípidos, de polisacáridos, de polipéptidos, de lipopolisacáridos, de oligosacáridos, de copolímeros, de PAMs (patrones moleculares asociados a patógenos), de ligandos del "receptor similar a toll", de MPLA (monofosforil lípido A), de Quil-A, de ISCOM, de bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDAB) o cloruro de dimetil dioctadecil amonio (DDAC), de motivos CpG, de Leif, de toxoides, por ejemplo toxina del cólera (CT), LT (toxina termolábil) y versiones destoxificadas de CT o LT, etc. También se pueden usar todas las demás moléculas de tipo "adyuvante" descritas en la bibliografía para esta vía de inmunización.

Estos adyuvantes son productos que incrementan las reacciones del sistema inmunitario de los seres humanos cuando se administran en presencia del antígeno. Estos incrementan la producción de inmunoglobulinas específicas, anticuerpos, y estimulan numerosas células implicadas en los mecanismos de defensa inmunitaria.

Estas partículas que exhiben una sección transversal que tiene un diámetro de entre 0,1 nm y 0,2 µm se pueden colocar en un vehículo adecuado, por ejemplo gelatina de petróleo, que no disuelve la preparación de vacuna y que se puede aplicar en la piel, preferiblemente en la mejilla o en la parte inferior de la espalda del ser humano a vacunar. Una vez depositadas en la superficie de la piel, preparada con antelación, las partículas irán hacia los folículos pilosos, de una manera dirigida debido a su diámetro pequeño. La preparación de vacuna se disolverá después en el lugar por medio del líquido intersticial, lo que proporcionará la vacuna a una concentración elevada, *in situ*.

Las partículas según la invención son útiles así para preparar una composición de vacuna terapéutica que las comprende. La composición de vacuna está destinada al uso en seres humanos en los que pueden tener un fin curativo o preventivo. Esta composición de vacuna terapéutica es útil para dirigir específicamente, a través de los folículos pilosos, los componentes de vacuna de la preparación de vacuna hacia las células presentadoras de antígenos. Una vez preparada, esta composición de vacuna tiene la ventaja de ser termoestable, lo que la hace fácilmente utilizable en condiciones climáticas difíciles.

El uso según la invención permite así el direccionamiento específico de los componentes de la preparación de vacuna hacia los folículos pilosos y, como resultado, hacia un número muy grande de células presentadoras de antígenos de la dermis y de la epidermis. Este método específico de administración permite la captación rápida de los componentes de la vacuna por las células seleccionadas como objetivo (células de Langerhans y células dendríticas) y también la captura y la expresión de los componentes de la vacuna por las células presentadoras de antígenos y la activación de estas células. Por lo tanto, se mantiene una reserva importante de antígenos localizada en las células presentadoras de antígenos profesionales.

Debido a la especificidad del direccionamiento específico, se obtiene una concentración elevada de antígenos en un área superficial reducida de aplicación de la vacuna en la piel del paciente.

A continuación, las células presentadoras de antígenos migran hacia los órganos linfoides secundarios y se observa la inducción de una respuesta inmunitaria humoral y celular. Esto permitirá así el establecimiento de una inmunidad protectora a largo plazo tras la vacunación.

Se puede recordar que la respuesta inmunitaria pasa por las células linfocíticas, en particular las células B y los linfocitos T. Estos últimos se pueden clasificar en dos subtipos basándose, entre otros, en la expresión de los antígenos de superficie CD4 y CD8. Las células T CD4 están implicadas generalmente en funciones "auxiliares". En particular, secretan citocinas que inducen la proliferación y maduración de las otras células linfocíticas. Las células T CD8, que se expresan de manera predominante en comparación con las células T CD4, corresponden a las células implicadas en una respuesta inmunitaria celular citotóxica que se denomina de tipo CTL.

En particular, se ha descrito una actividad citotóxica directa para ciertos linfocitos T CD4+. Existen dos tipos de respuestas inmunitarias efectoras: la respuesta humoral debida a anticuerpos y la respuesta citotóxica debida principalmente a los linfocitos T CD8. Una respuesta citotóxica eficaz requiere la presentación de los antígenos a los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTLs) conjuntamente con las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad MHC, pero también a los linfocitos T auxiliares CD4+ conjuntamente con las moléculas de clase II del MHC.

Aunque se considera que los anticuerpos mucosos y sistémicos desempeñan un papel importante en la prevención de ciertas infecciones, la inducción de la inmunidad mediada por células, que incluye la inducción de una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL), es especialmente necesaria para combatir patógenos intracelulares (virus, bacterias o parásitos) y para controlar los procesos tumorales. La inducción y la regulación de los CTLs depende de las citocinas (IL-2, etc.) producidas por la subpoblación Th1 de las células auxiliares CD4. Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) desempeñan un papel esencial en la "eliminación" de patógenos intracelulares y también en el control de tumores. Los linfocitos T CD8 reconocen los fragmentos peptídicos, derivados de la degradación intracelular del antígeno, en forma de un complejo con las moléculas de la clase I del MHC expresadas en la superficie de la célula. Este reconocimiento conduce a la lisis de las células que portan el complejo MHC-peptido antigénico. Los CTLs también generan diversas linfocinas (IFNγ y TNFα) que pueden ser, como complemento, directamente citolíticas. La inducción de CTLs se considera, por lo tanto, un componente esencial de las vacunas diseñadas para la prevención y el tratamiento de estas enfermedades. Entre los tratamientos actualmente propuestos para combatir cánceres e infecciones virales crónicas, la vacunación se está convirtiendo en un componente cada vez más importante. El objetivo de la vacunación terapéutica es inducir o reestimar *in vivo* una respuesta inmunitaria específica capaz de destruir células infectadas o células tumorales. La respuesta inmunitaria de los pacientes se debe modular de manera que sea eficaz e induzca una respuesta mediada por células específica para los antígenos expresados, por ejemplo, por el tumor, y que sea capaz de eliminar las células tumorales.

El uso transcutáneo de esta preparación de vacuna induce todas las respuestas inmunitarias celulares (CD4, CD8, etc.) y humorales (producción de anticuerpos, respuestas de células B, etc.) en seres humanos. Así, la vacunación transcutánea es aplicable a vacunas de cualquier tipo, y hace posible inducir una respuesta inmunitaria protectora contra la vacuna dirigiendo específicamente la vacuna directamente a las células presentadoras de antígenos profesionales.

Además, la respuesta inmunitaria inducida por la vacunación transcutánea puede diferir cualitativamente de la respuesta inmunitaria obtenida mediante una inyección intramuscular convencional. De hecho, se pueden hallar células CD8 positivas tras una vacunación transcutánea en voluntarios humanos, mientras no se hallaron células CD8 detectables tras una vacunación intramuscular. En una realización específica, el uso transcutáneo de esta vacuna permite la inducción de una respuesta inmunitaria de células T CD8.

Esta vía de administración también podría ser interesante en individuos inmunodeprimidos. De hecho, estos individuos responden escasamente a la mayoría de vacunas administradas a través de una vía convencional (intramuscular, subcutánea o intradérmica)

Cuando se inyectan a través de una vía intramuscular en individuos sanos, las vacunas vivas atenuadas inducen fácilmente células T CD8 potentes que son esenciales para el control de muchos patógenos (principalmente virus) y tumores. Sin embargo, estas vacunas (tales como contra tuberculosis, sarampión, paperas, rubeola, varicela, fiebre amarilla, viruela...) están contraindicadas en todos los individuos inmunodeprimidos, tanto de forma crónica como transitoria, tal como durante el embarazo, debido al riesgo de diseminación incontrolada del patógeno vivo atenuado en los individuos inmunodeprimidos. En contraste, las vacunas inertes o inactivadas que no se replican, que están permitidas en tales individuos inmunodeprimidos, no pueden inducir respuestas de células T CD8. Por lo tanto, los individuos inmunodeprimidos no se pueden proteger contra las enfermedades mencionadas anteriormente u otras que requieran respuestas de células T CD8.

Al contrario, una administración transcutánea de una preparación de vacuna inerte o inactivada permite el direccionamiento específico directo hacia las células dendríticas de la piel que rodean los folículos pilosos, la carga mejorada *in vivo* de antígenos de vacuna en estas células dendríticas y la presentación cruzada de antígenos inertes exógenos a través de las moléculas de la clase I de HLA a los linfocitos T CD8, por estas células dendríticas seleccionadas como objetivo una vez que alcanzan los nódulos linfáticos de drenaje.

Todos los grupos de individuos inmunodeprimidos se benefician del proceso:

- Pacientes infectados por VIH
- Receptores transplantados
- Pacientes con regímenes inmunodepresores, quimioterápicos, o pacientes irradiados,
- Pacientes con cualquier tipo de inmunodeficiencia adquirida o congénita o heredada (tal como SCID [inmunodeficiencia combinada grave], síndrome de DiGeorge...).
- Embarazo (debido a la inmunodepresión transitoria observada durante el embarazo) que impone otra contraindicación para las vacunas vivas debido al riesgo de diseminación al feto.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitarla de ninguna manera.

Ejemplo 1: Efecto del tratamiento de la piel con un adhesivo

Se colocan y se fijan muestras de piel humana tomadas durante cirugía plástica en un soporte húmedo. Se deposita el adhesivo (pegamento de cianoacrilato UHU) de manera que se cubre la superficie de la piel, y se coloca una tira adhesiva (Tesa) sobre ella. La tira adhesiva se retira después de 10-15 minutos de contacto a temperatura ambiente. Se aplican nanopartículas de poliestireno de 0,04 μm de diámetro revestidas con moléculas "fluorescentes verdes-amarillas" (Fluosphère®, Molecular probes, Oregón, EE.UU.) en un área superficial de 1 cm^2 durante 18 horas a 37 °C.

La piel se trata después más de tres veces seguidas con el pegamento o simplemente una vez para estimular el efecto de este tratamiento sobre la destrucción de la capa córnea.

Cada aplicación del adhesivo retira de hecho un 30% de la capa córnea.

La Figura 1, parte inferior, muestra que el tratamiento agresivo de la piel mediante el uso del pegamento de cianoacrilato (más de 3 aplicaciones de adhesivo en la misma área superficial de piel) provoca la destrucción de la capa córnea y también la parte superficial de la epidermis. Las partículas cruzan después la epidermis y difunden hacia la capa de queratinocitos de una manera inespecífica.

El tratamiento suave de la piel con el pegamento de cianoacrilato (en este caso, una única aplicación de adhesivo) da como resultado solamente la extracción parcial (menor de o igual al 50%) de la capa córnea, tal como se puede observar en la parte superior de la Figura 1.

Ejemplo 2: Especificidad del tamaño de las partículas

Los folículos pilosos que se originan a partir de explantos de piel humana extraída tras cirugía plástica se abrieron mediante el uso del método descrito anteriormente con una única aplicación de adhesivo. Se someten a sonicación

disoluciones que contienen microesferas esféricas sólidas, idénticas a las usadas en el Ejemplo 1, pero de diversos tamaños (tamaño de 1,5 a 0,04 μm), durante 3 minutos y después se depositan sobre la piel pretratada, durante 15 a 16 horas a 37 °C. Después se aplican tiras adhesivas para retirar el resto de las microesferas de la superficie. La muestra de piel se congela después en nitrógeno líquido, y después se preparan cortes de 5 micras de grosor cortando desde la dermis a la epidermis. Se visualiza la penetración de las microesferas de 0,04 μm mediante técnicas de microscopía confocal con el uso de un escáner.

La Figura 2 demuestra que las microesferas de 0,04 μm penetran profundamente en los folículos pilosos y persisten después de lavados sucesivos, mientras que las esferas que tienen un tamaño del orden de 0,75 μm permanecen en niveles superficiales de la vía de los folículos pilosos (Figura 3).

Ejemplo 3: Localización de las células de Langerhans

Después de una etapa de saturación mediante el uso de una disolución de proteína (DAKO protein block, Dako), se incuban cortes congelados de piel humana en una disolución de anticuerpos anti-CD1a (dilución 1/50, Dako), que es un anticuerpo específico para las células de Langerhans y para las células dendríticas. Estas células expresan, de hecho, moléculas CD1a.

Los cortes se lavan en tampón fosfato (PBS de pH 7,4) y después se incuban en una disolución de anticuerpos anti-inmunoglobulina de ratón (dilución 1/50, Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.) acoplados a fluoresceína durante 45 minutos. Después de lavar, los portaobjetos se montan con una disolución de montaje VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.).

El marcaje específico de estas células de Langerhans hace posible visualizar su localización mediante microscopía de fluorescencia. La Figura 4 muestra que la región inferior de los folículos pilosos es especialmente rica en marcadores de las células de Langerhans (células presentadoras de antígenos de la epidermis) y de las células dendríticas (epidermis y dermis).

Ejemplo 4: Direccionamiento específico de las microesferas hacia las células de Langerhans.

El ejemplo anterior demostró que las partículas fluorescentes difunden hacia las regiones próximas ricas en células presentadoras de antígenos (APCs). La mayoría de las células de Langerhans, que son parte de las APCs, tapizan de hecho esta región que rodea los folículos pilosos.

La piel se trata por medio de la técnica de apertura de folículos pilosos descrita anteriormente tras una única aplicación del adhesivo de cianoacrilato. Una disolución que contiene $2,5 \times 10^{12}$ partículas esféricas sólidas de 0,04 μm de tamaño, marcadas con fluoresceína, se somete a sonicación durante 3 minutos y después se deposita sobre la piel pretratada, durante 15 a 16 horas a 37 °C. Se lleva a cabo una digestión durante 18 horas en una disolución de dispasa (2,4 U/ml, Dispase I, Roche) a 37 °C, seguido de tripsinización (0,025% de tripsina (Sigma) y CaCl_2 1,5 mM en PBS, a pH 7,4) durante 10 minutos a 37 °C, antes de resuspender las células de piel en RPMI 1640 (Gibco, Escocia) que contiene un 15% de suero bovino fetal (Paa GmbH, Austria), penicilina y estreptomycin. Las células de Langerhans presentes en la suspensión celular se purifican después mediante el uso de anticuerpos anti-CD1c por medio del método de purificación de microesferas según las indicaciones del fabricante (MACS®, Miltenyi).

Las células purificadas se depositan después sobre un portaobjetos. La Figura 5 muestra que se observa mediante microscopía de fluorescencia la presencia de partículas esféricas de 0,04 μm en el citoplasma celular de las células de Langerhans.

Ejemplo 5: Método de vacunación transcutánea en modelos murinos:

Se prepara una disolución de anestésico diluyendo 30 μl de xilasina del 2% (Bayer, Alemania) y 160 μl de ketamina (Imalgène 500, Merial) en 1 ml de NaCl a una concentración de 9 g/l. Se anestesian ratones C57BL6 de cinco a ocho semanas de edad que tienen un haplotipo H-2K^b (Iffa-Credo, Charles River, Francia) inyectando una dosis de 10 μl por gramo de ratón de esta disolución de manera intraperitoneal. Se retira el pelo del flanco derecho mediante el uso de tiras adhesivas (Lyréco, Francia) en un área superficial de aproximadamente 1 cm^2 . Los folículos pilosos se abrieron después de aplicaciones sucesivas de tiras adhesivas (más de 10 aplicaciones en los ratones). Este método hace posible abrir los poros pilosos retirando parcialmente la capa córnea. La preparación de vacuna inmunógena (10 μl de la vacuna comercial "TETAGRIP" (Aventis Pasteur)) se deposita después sobre la región de la que se ha retirado el pelo, mediante el uso de una pipeta, en un área superficial de 0,5 cm^2 . Después de esperar durante un periodo de 30 minutos a 1 hora necesario para la penetración de la preparación de vacuna, se aplica un parche compuesto de ácido salicílico (1,5%) (agente activo exfoliante y limpiador), de triclosan (0,3%) (agente antibacteriano y antifúngico), y de bisabolol (1%) (agente anti-inflamatorio y calmante) (SVR, parche Lysanel, Francia) durante una hora.

La sangre extraída se trata en condiciones estériles. Una vez diluida con 4 volúmenes de PBS 1x, se toma una muestra de la sangre con una pipeta y se deposita lentamente en un tubo que contiene 1,5 ml de medio separador de linfocitos o FICOLL (Eurobio, Francia). La centrifugación a 2200 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente sin frenado hace posible obtener la separación de los eritrocitos sanguíneos, que sedimentan en el fondo del tubo, y

la aparición de un anillo que contiene las PBMCs (células mononucleares de sangre periférica). La suspensión celular derivada del anillo se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos. Las células de sangre periférica se cuentan con un hemocitómetro Mallassez mediante el uso de azul tripan.

El objetivo de la técnica es medir la cantidad de células que responden hacia un antígeno dado. El interferón gamma (IFN γ) producido por las células linfocíticas T efectoras (100.000 PBMCs/pocillo) durante la estimulación antigénica se captura de esta manera durante 48 horas mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico para este interferón (anticuerpo de captura: anti-IFN γ (IgG1, clon DB-1; Diaclone) y se mide mediante el uso de la técnica ELISPOT-IFN γ (según el fabricante, Diaclone). Las frecuencias de las células inmunitarias T específicas de la vacuna TETAGRIP se miden de esta manera en diversos días tras la inmunización (Figura 6).

Para estudiar el efecto de la vacunación transcutánea sobre la proliferación *in vivo* de los linfocitos T, se usó el antígeno de ovalbúmina (ova) como agente inmunógeno. Como resultado, se puede seguir la proliferación de las células T CD8 $^{+}$ específicas del antígeno de ovalbúmina *in vivo*, tras la transferencia adoptiva de las células T CD8 anti-ova T marcadas con una molécula fluorescente: CFSE (5-(y 6)-diacetato de carboxifluoresceína, éster de succinimidilo).

Brevemente, linfocitos CD8 anti-ova sin exposición previa, que se originaron del ratón OT-1 (marcador congénico CD45.2, transgénico para el receptor de células T (TCR) específico para el epítipo OVA [257-264] de ovalbúmina en un origen genético H2-Kb) se marcan con CFSE y después se inyectan de manera intravenosa en ratones receptores (marcador congénico CD45.1) vacunados de manera transcutánea según el protocolo descrito anteriormente, con la proteína ovalbúmina o con ADN plasmídico que codifica esta proteína. CFSE, detectable mediante citometría de flujo, es un marcador para la división celular. Se difunde en el citoplasma y se diluye a lo largo del transcurso de las divisiones celulares, por lo que conduce a una disminución de su intensidad. Los ratones se sacrifican 4 ó 7 días después de la inmunización, y se extraen los nódulos linfáticos. Un marcaje doble, CD8 y CD45.2, hace posible seleccionar la población de linfocitos CD8 $^{+}$ que se origina a partir del ratón OT-1.

La Figura 7 muestra que la proliferación celular en los ratones inmunizados es significativamente mayor que la de los ratones de "control" que no recibieron antígeno, sea cual sea la forma de inmunógeno utilizada (proteína o ADN).

La respuesta inmunitaria humoral detectada mediante la producción de anticuerpos anti-ovalbúmina se mide por medio de ensayos ELISA específicos del antígeno tras la vacunación mediante el uso del ADN plasmídico que codifica el antígeno de ovalbúmina o la proteína en presencia de un adyuvante: toxina del cólera. Brevemente, se inmunizan ratones C57BL6 con 100 μ g de proteína ovalbúmina (n=6), o 100 μ g de proteína ovalbúmina con 10 μ g de toxina del cólera marcada con FITC (fluoroisotiocianato), o 100 μ g de ADN plasmídico que codifica la proteína ovalbúmina (n=8). Los anticuerpos se analizaron mediante la técnica ELISA con el uso de los sueros originados a partir de muestras de sangre tomadas en el D 14 tras la vacunación. Se representan las desviaciones estándar (Figura 8).

Ejemplo 6: Localización de las partículas en un modelo murino

Se aplicaron partículas en forma de microesferas fluorescentes (Fluorosphere® de 0,04 μ m) en la piel de un ratón según el protocolo descrito en el Ejemplo 6. La fluorescencia se visualiza por medio de la técnica de microscopía láser a diversas profundidades en la piel (Cell-Vizio®, MaunaKea technologies). Este método también hace posible localizar las partículas en diversos momentos *in vivo*. Cell-Vizio™ es un sistema de microscopía de fibra óptica de fluorescencia confocal. La primera sonda óptica usada para la adquisición de imágenes tiene un diámetro de 1,5 mm (ref. S1500-5.0); esta sonda hace posible obtener imágenes inmediatamente por debajo de la superficie de un tejido biológico, con un grosor de 15 μ m y una resolución lateral de 5 μ m. Las siguientes 2 sondas tienen un diámetro de 1,8 mm y permiten una adquisición de 20 μ m a una profundidad de 30 μ m (ref. HD-1800-2.5/30) o 80 μ m (ref. HD-1800-2.5/80) con una resolución lateral de 2,5 μ m. Durante el periodo de adquisición, en diversos momentos tras la aplicación de los fluoróforos, los ratones están bajo anestesia para impedir cualquier movimiento. El área de la cual se ha retirado el pelo se limpia con antelación con una solución salina para eliminar las impurezas residuales del área, antes de añadir las diversas sondas. Para analizar los nódulos linfáticos, se retira la grasa del órgano con antelación, antes de aplicar la sonda a su superficie.

1 a 5 horas tras la aplicación de las microesferas en la piel, estas últimas se hallan en cavidades en la capa córnea a una profundidad de 15 μ m a 80 μ m (Figura 9A). Después de 24 horas, la fluorescencia se difunde alrededor de los folículos pilosos en áreas ricas en APCs (Figura 10A). Sin embargo, no hay indicios de fluorescencia en otras áreas sin tratar del ratón (Figura 10B). Las microesferas se acumulan en los nódulos linfáticos proximales y, en un grado menor, en los nódulos linfáticos distales con respecto al área tratada (Figura 11).

Así, las microesferas se transportan al lugar de la respuesta inmunitaria desde las 24 horas tras la aplicación transcutánea.

Ejemplo 7: Medida de la respuesta T protectora específica

Los ratones se inmunizaron mediante el método descrito según el Ejemplo 5, con el uso de ADN que codifica ovalbúmina. Tras la vacunación, se inyectan 200.000 células tumorales de la línea que expresa el antígeno de ovalbúmina (EG-7) o que no lo expresan (EL-4) de manera subcutánea en el flanco izquierdo de los animales. El tamaño del tumor se mide en diversos momentos en los animales inmunizados.

La Figura 12 muestra que la vacunación transcutánea induce una respuesta inmunitaria protectora en un 90% de los ratones, que nunca desarrollan un tumor en el día 40, mientras todos los ratones de control ya han desarrollado un tumor en el día 22.

Ejemplo 8: Inducción de respuestas inmunitarias en seres humanos

5 Este protocolo se aplicó a siete voluntarios normales que recibieron, en la superficie superior del brazo, la vacuna de la gripe A y B (Agrippal® Chiron, Francia) de manera transcutánea, sobre un área superficial de 16 cm² o sobre un área superficial de 32 cm² de piel. La aplicación se llevó a cabo a temperatura ambiente. La vacuna Agrippal® consiste en antígenos purificados, y no en virus completos inactivados. Los voluntarios permanecieron sentados en la habitación de pruebas antes de la aplicación, durante 30 minutos, y también durante los periodos de incubación entre las diversas etapas de la aplicación. Después de la aplicación de la vacuna, se advirtió a los voluntarios que no se duchasen o bañasen, y que evitasen cualquier actividad que provocase sudoración o esfuerzo mecánico en el lugar de investigación, es decir, ejercicio físico, durante las 24 horas tras la aplicación de la vacuna. Cuatro individuos se vacunaron también de manera intramuscular. Todos los voluntarios firmaron un formulario de consentimiento informado. Se monitorizó a los voluntarios durante la primera semana tras la administración en cuanto a efectos secundarios tales como un enrojecimiento anormal de la piel, una sensación de picor, una sensación dolorosa o punzante durante los cinco minutos tras la aplicación, o una pérdida de capa córnea.

En el momento de la aplicación, el brazo izquierdo de los voluntarios se mantuvo a 90° y colocado horizontalmente sobre un área hecha de plástico, con la parte superior externa del brazo hacia arriba. El brazo se mantuvo en esta posición a lo largo de todo el periodo de aplicación. Se delimitaron uno o dos cuadrados de 4 x 4 cm en la parte superior externa del brazo izquierdo de los voluntarios por medio de una matriz de plástico. Los sitios de investigación se delimitaron después mediante el uso de un rotulador indeleble (rotulador para piel H7003, Falc).

Se afeitó el vello en los sitios de investigación y también en la porción de piel cercana (2 cm a cada lado de cada sitio de investigación) mediante el uso de una cuchilla de afeitar seca (Disponible Hospital Razor, n° de art.: 182 h, Wilkinson Sword GmbH, Solingen, Alemania).

25 Después del afeitado, se aplicó pegamento de cianoacrilato (Superglue, UHU GmbH & Co., KG, Buehl/Baden, Alemania) gota a gota (9 gotas, es decir, aproximadamente 190 mg) en cada sitio de investigación. Se usó un portaobjetos de vidrio de microscopio para extender el pegamento uniformemente sobre los sitios de investigación. Inmediatamente después de realizar la extensión, se colocó una tira adhesiva (6 x 5 cm, N° 57176-00000, 66 m x 50 mm, Tesa® Beiersdorf, Beiersdorf, Alemania) sobre el sitio de investigación. Se colocó una hoja de papel (21 x 7 cm) sobre la tira y se hizo rodar una goma alrededor de los sitios de investigación para evitar la formación de burbujas de aire en la superficie de la piel. Después de 20 minutos, la tira y el pegamento adherente se retiraron rápidamente de la superficie de la piel.

La retirada de la superficie de la piel con cianoacrilato retira el material queratinizado, los lípidos y otros restos celulares y aproximadamente un 30% de la capa córnea. La capa córnea restante y la epidermis viable permanecen intactas.

A continuación, se delimitaron los sitios de investigación con una barrera de silicona (Window-Colour-Konturpaste, N° 4469/ko, Max-Bringmann GmbH & Co., Wendelstein, Alemania) para evitar la diseminación de la vacuna soluble aplicada posteriormente. La barrera de silicona se debe secar durante 20 minutos. Durante este periodo de incubación, los voluntarios permanecieron sentados y el brazo izquierdo permaneció en su posición.

40 Para una aplicación sobre un área superficial de 32 cm², se aplicaron 250 µl de vacuna Agrippal® gota a gota mediante el uso de la jeringa proporcionada por el fabricante, en la superficie de la piel de cada sitio de investigación. Para la aplicación sobre un área superficial de 16 cm², se aplicó la misma cantidad de vacuna dos veces. Este procedimiento va seguido de incubación durante 20 minutos. Después se aplica un vendaje de hidrocoloide (Comfeel® Plus Transparent 9 x 14 cm, n° de art.: 3542, Coloplast A/S, Dinamarca) durante 24 horas para proteger los sitios de investigación.

Después se recogieron 15 ml de sangre periférica y las células mononucleares de sangre periférica se aislaron con Ficoll. Todas las investigaciones inmunológicas se llevaron a cabo con células recientes y suero congelado.

La detección de ELISpot-IFNγ para las PBMCs humanas (células mononucleares de sangre periférica) se llevó a cabo como se describió previamente (Combadiere et al., JEM). Brevemente, se revistieron placas ELISpot de 96 pocillos (Millipore, Molsheim, Francia) con un anticuerpo anti-IFNγ humano (IgG1/B-B1, Diaclone, Estrasburgo, Francia). Después de haber bloqueado con suero bovino fetal del 10%, los pocillos por triplicado se llenaron con 10⁵ PBMCs recién aisladas. Las placas se incubaron a 37 °C durante 20 horas con 0,45 mg/ml de vacuna Agrippal® (Chiron). Se usó PHA (Abbott, Rungis, Francia) y medio solo como controles positivos y negativos, respectivamente. Después se lavaron los pocillos, se detectaron los puntos tras la adición de un anticuerpo anti-IFNγ humano acoplado a biotina (B-G1, Diaclone) durante 4 horas a 37 °C, seguido de incubación con estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C, seguido de visualización con fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/4-nitroazul de tetrazolio (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Francia). Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que aparecieron los puntos. Las células que formaban puntos específicos para el antígeno (SFCs) se contaron con un

microscopio automático (Zeiss, Le Pecq, Francia). Las muestras se consideraron positivas tras la detección de al menos 50 SFCs por millón de PBMCs por encima del nivel basal.

Resultados:

No se observaron efectos secundarios en los voluntarios que siguieron el tratamiento.

- 5 Debido a que todos los voluntarios recibieron la misma cantidad de vacuna (0,5 ml de Agrippal®), se comparó la respuesta inmunitaria celular contra la vacuna de la gripe B en los días 0, 14 y 28 para todos los voluntarios (Figuras 13 y 14A y B). La figura 13 muestra que se pueden observar respuestas celulares significativas con la vía de administración transcutánea o la vía de administración intramuscular.

- 10 Las Figuras 14A y 14B muestran que se observaron respuestas celulares significativamente incrementadas en el día 14 ($n=7$, $p<0,05$) y en el día 28 ($n=6$, $p<0,05$). Este ensayo hace posible, de hecho, detectar células T efectoras CD4 y CD8 dirigidas contra las proteínas de la gripe.

- 15 En el día 0, en ciertos individuos, la cantidad de células T efectoras está por encima del nivel basal (50 SFU/millón de PBMC), lo que sugiere una inmunidad preexistente hacia la gripe B (Figuras 13 y 14). De manera ventajosa, también se observó una respuesta de células T incrementada tras la vacunación en algunos de estos individuos, lo que confirma la eficacia de la vacunación transcutánea en seres humanos.

En conclusión, la vacunación transcutánea con la vacuna Agrippal® da como resultado una inducción de la respuesta inmunitaria en los voluntarios analizados.

Ejemplo 9: La vacunación transcutánea indujo respuestas celulares tanto CD4 como CD8, mientras la vacunación intramuscular induce solamente una respuesta CD4

- 20 La producción de IFN γ por las poblaciones de células CD4 y CD8 se analizó mediante el uso de análisis de citometría de flujo, tras una estimulación a corto plazo (16 horas) de PBMCs con la vacuna "Agrippal". La administración transcutánea de la vacuna Agrippal se ha llevado a cabo como se explicó previamente. La inyección intramuscular de la vacuna Agrippal® (0,5 ml) como especificó el fabricante se inyectó de manera intramuscular en el músculo deltoides del brazo izquierdo tras una desinfección cuidadosa, según las Prácticas Clínicas Adecuadas.

- 25 Brevemente, se descongelaron PBMCs congeladas en RPMI (Life Technologies, Cergy Pontoise, Francia) que contenía un 5% de FCS (Seromed, Alemania), 2 mmol/L de L-glutamina (Gibco BRL, Life Technology, Paisley, Escocia) y antibióticos (1000 UI/mL de penicilina sódica, 1 mg/mL de sulfato de estreptomicina, y 250 ng/mL de anfotericina B). Las células se estimularon con 1 μ g/mL de PHA durante 12 horas a 37 °C. Se añadió brefeldina A (5 μ g/ml) (Sigma Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, Francia) al pocillo 4 horas antes de la recogida para detectar las citoquinas intracelulares. Las células se tiñeron después con anticuerpos hacia CD4 o CD8 conjugados a PC7 (Beckman Coulter, Nyon, Suiza), se lavaron en PBS y se fijaron en un 4% de PFA durante 20 min. Las células se permeabilizaron después con PBS del 5%, FCS del 0,1%, saponina antes de la adición de anticuerpos específicos anti-IFN γ . Se acumularon y se analizaron al menos 1.000.000 señales según los parámetros de dispersión frontal y lateral, con el soporte informático Cell-Quest Pro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.).

- 35 La Figura 15A muestra que el porcentaje de células CD4 que producen IFN γ se incrementa después de la vacunación transcutánea e intramuscular en el día 14 y el día 28. El incremento de la respuesta de células CD4 fue significativo tras la vacunación transcutánea en el día 28 en comparación con el día 0. También fue significativamente diferente tras la inyección intramuscular convencional en el día 14 y 28 en comparación con el día 0. Estas vacunaciones parecen inducir respuestas de células efectoras CD4 similares en todos los individuos.

- 40 La Figura 15B muestra un incremento de las células CD8+IFN γ + específicas de la gripe en el día 14 en los individuos que habían recibido una vacunación transcutánea, mientras las respuestas de CD8 fueron indetectables en todos los voluntarios que fueron vacunados mediante inyección intramuscular.

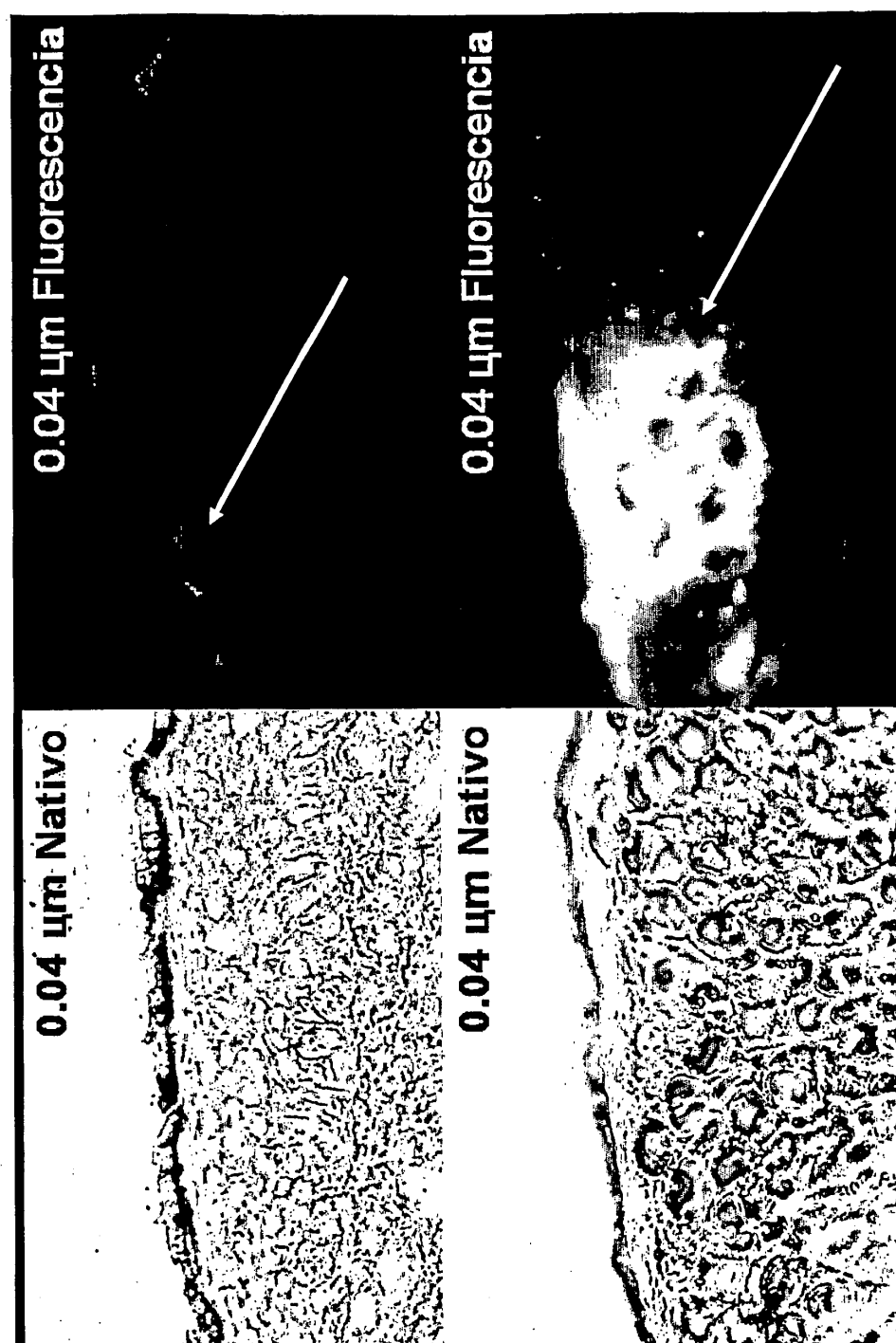
- 45 La Figura 16 muestra un análisis mediante citometría de flujo representativo de células CD4 y CD8 de un voluntario, que recibió la vacuna de manera transcutánea. Esta figura confirma que tanto las células CD4 como las células CD8 se inducen mediante esta vía de vacunación.

Los resultados demuestran que solamente la vacunación transcutánea indujo una respuesta de células tanto CD4 como CD8, mientras la vacunación intramuscular indujo respuestas celulares más prominentes para CD4, pero no para CD8.

REIVINDICACIONES

1. El uso de partículas que exhiben una sección transversal que tiene un diámetro de entre 0,1 nm y 0,2 μ m, y dichas partículas inducen, estimulan o incrementan una respuesta inmunitaria protectora, para la preparación de una vacuna destinada a ser aplicada en la superficie de una piel tratada con antelación para abrir los folículos pilosos mediante ablación de como máximo un 50% de la capa córnea.
2. El uso según la Reivindicación 1, en el que las partículas exhiben una sección transversal que tiene un diámetro de entre 0,1 nm y 0,1 μ m.
3. El uso según la Reivindicación 2, en el que las partículas exhiben una sección transversal que tiene un diámetro de entre 0,1 nm y 0,05 μ m.
4. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, de partículas sólidas.
5. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, de partículas virales.
6. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de tratamiento previo se lleva a cabo mediante el uso de tiras adhesivas.
7. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa de tratamiento previo se lleva a cabo mediante la aplicación de un adhesivo o pegamento instantáneo en la superficie de la piel.
8. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, 6 y 7, en el que las partículas son microesferas de cera.
9. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, 6 y 7, en el que las partículas consisten en polietileno o poli(ácido láctico).
10. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en el que las partículas contienen un antígeno elegido del grupo que consiste en proteínas, péptidos, polisacáridos, poliósidos, lipopolisacáridos, toxoides, proteínas portadoras conjugadas, extractos de células, extractos virales, extractos bacterianos, extractos parasitarios, partículas virales, bacterianas o parasitarias vivas, atenuadas, muertas, inactivadas o recombinantes, pseudopartículas virales, ADN, ácidos nucleicos recombinantes de patógenos, moléculas implicadas en enfermedades infrecuentes y cánceres, y extractos de células cancerosas.
11. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10, en el que las partículas también pueden comprender adyuvantes elegidos del grupo que consiste en citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, derivados de patógenos, toxoides, una emulsión oleosa, lípidos, lipopolisacáridos, copolímeros, PAMs, ligandos del "receptor similar a toll", MPL-A, Quil-A, ISCOM, bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDAB) o cloruro de dimetil dioctadecil amonio (DDAC), motivos CpG, Leif, y toxoides destoxificados o no destoxificados.
12. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11, en el que las partículas comprenden ADN desnudo que codifica una parte del genoma del VIH.
13. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 11, en el que las partículas virales son partículas de VIH inactivadas que pueden ser recombinantes o no.
14. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 11, en el que las partículas virales son partículas de viruela atenuadas.
15. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 12, en el que las partículas comprenden nanopartículas de poli(ácido láctico) cargadas con péptidos y/o con proteínas y/o con ADN y/o con ácidos nucleicos.
16. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 15, para preparar una composición de vacuna terapéutica.
17. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque dicha composición es útil para dirigir específicamente, a través de los folículos pilosos, los componentes de la vacuna hacia las células presentadoras de antígenos.
18. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 17, y dichas partículas inducen, estimulan o incrementan una respuesta inmunitaria protectora de células T CD8.
19. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 18, en el que dichas partículas inducen, estimulan o incrementan una respuesta protectora en individuos inmunodeprimidos.

FIG. 1



2/16

FIG. 2

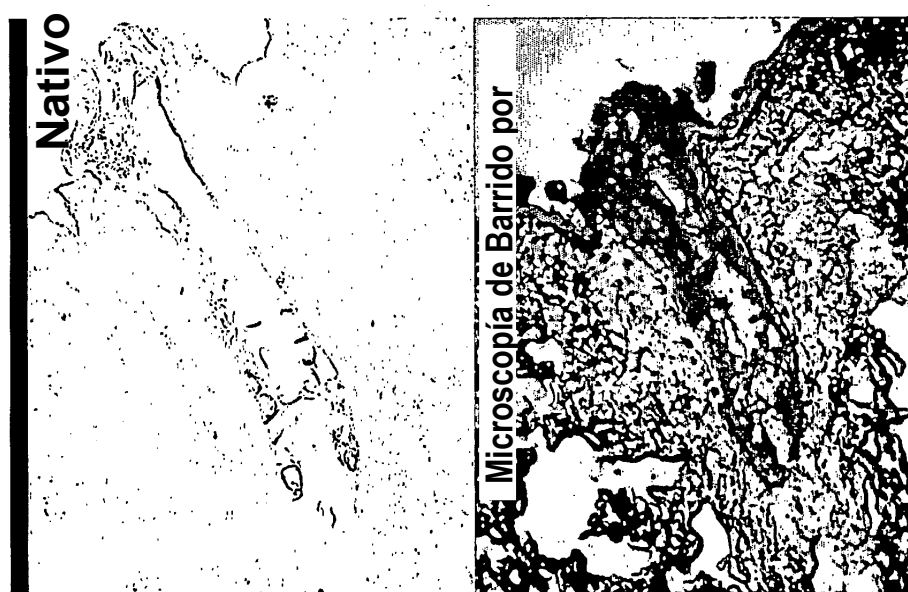
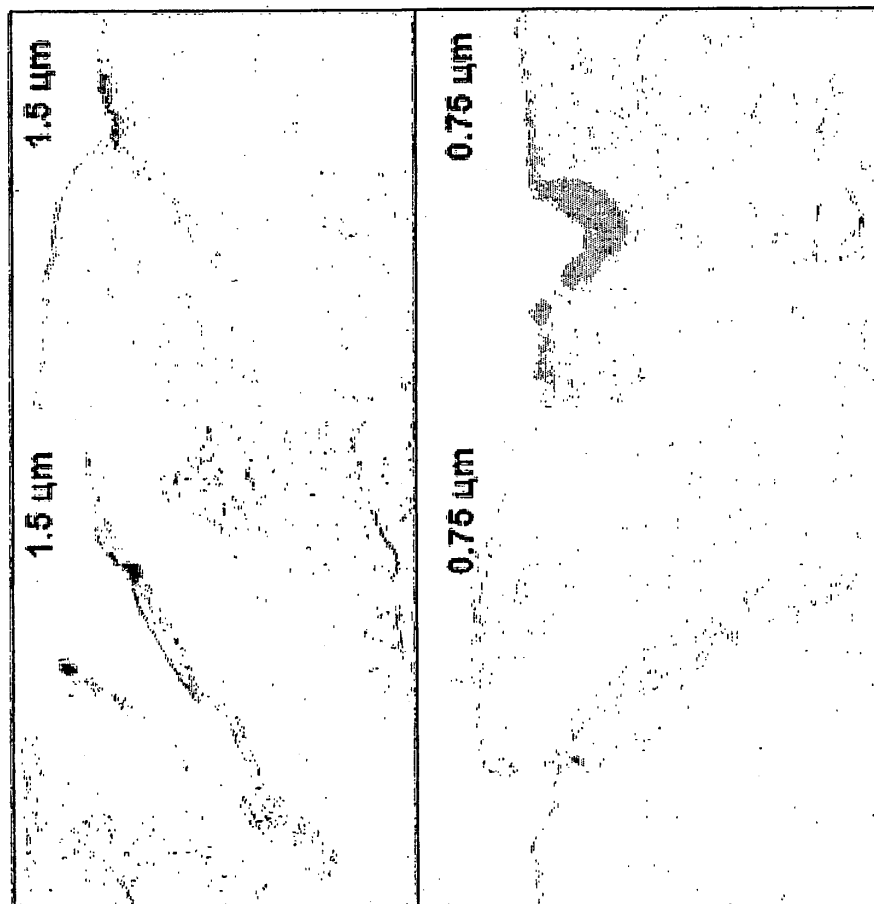
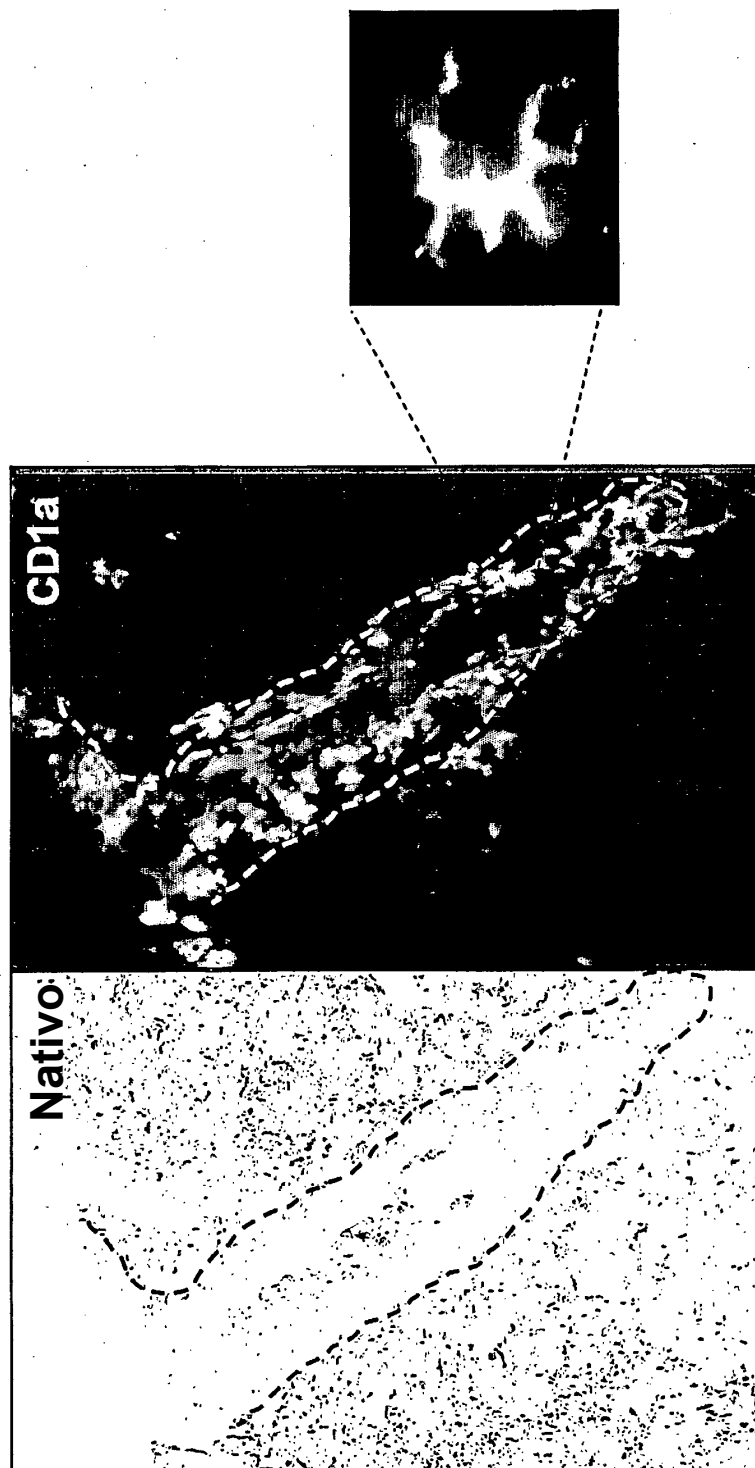


FIG. 3



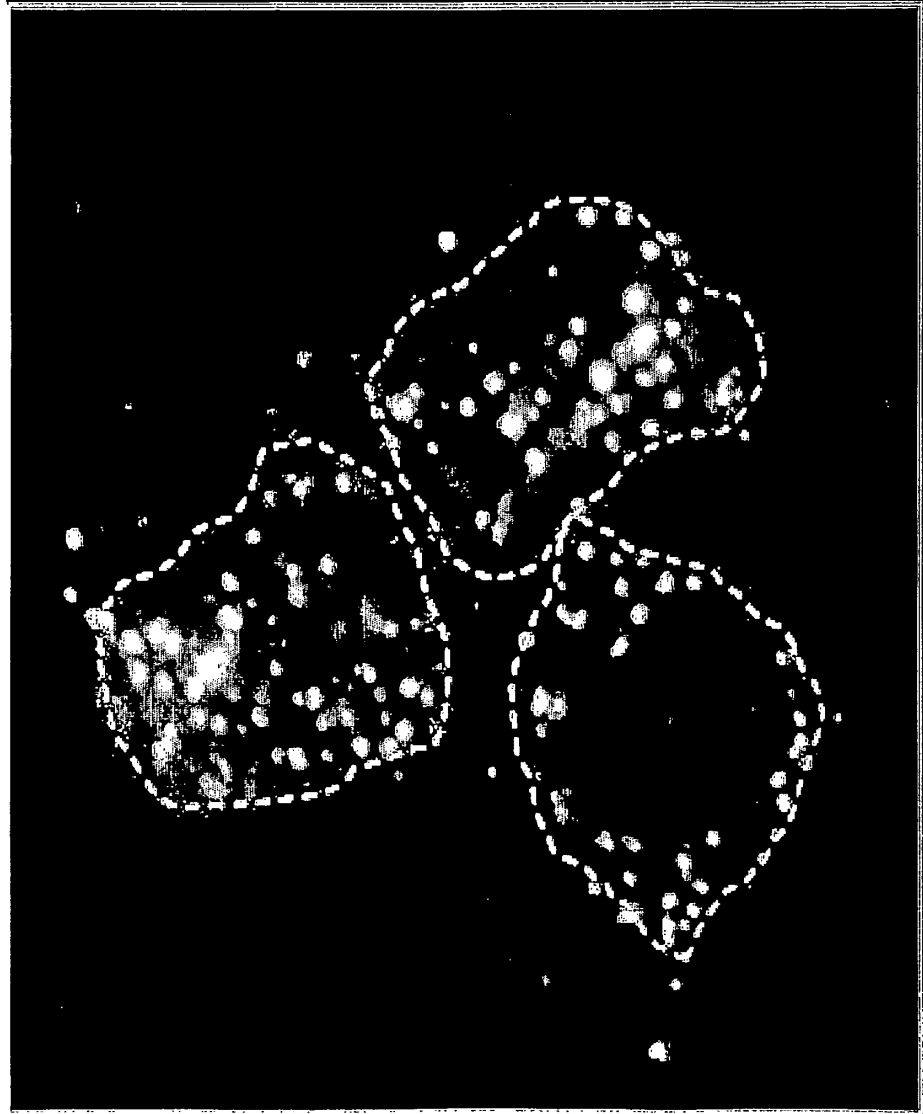
4/16

FIG. 4

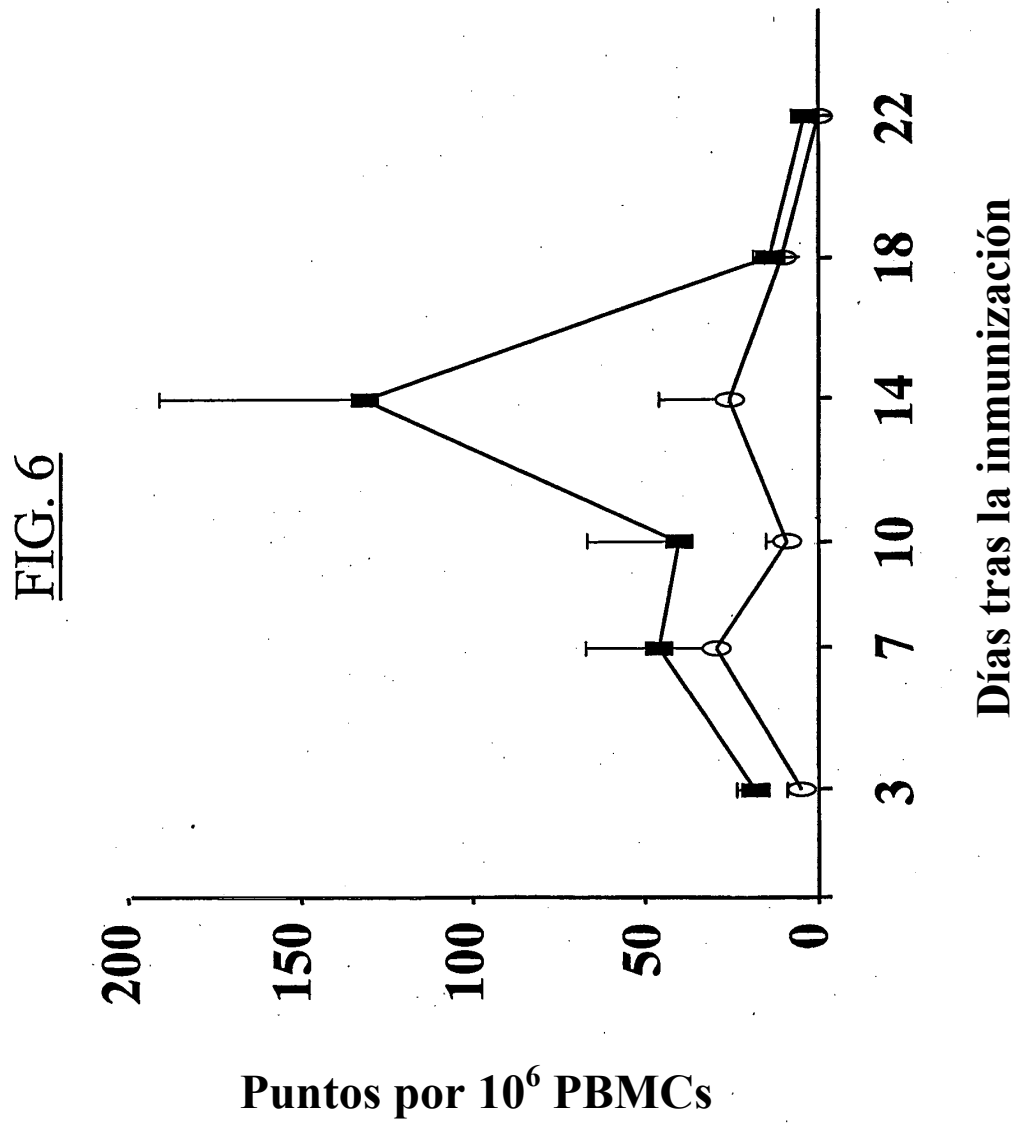


5/16

FIG. 5

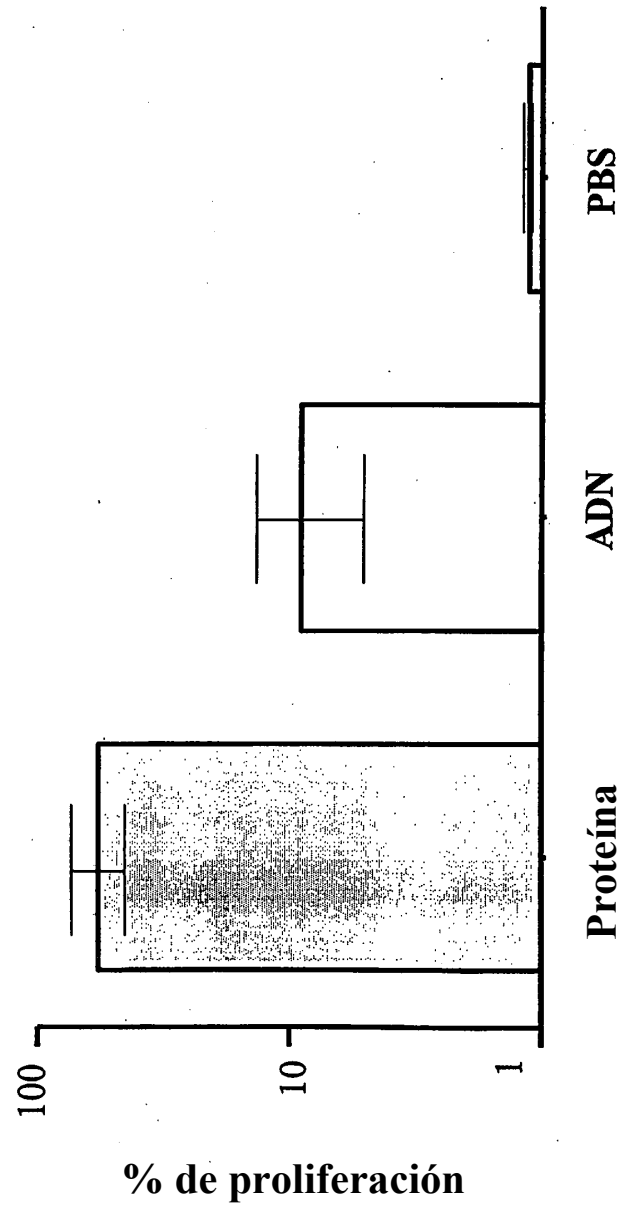


6/16



7/16

FIG. 7



8/16

FIG. 8



9/16

FIG. 9B

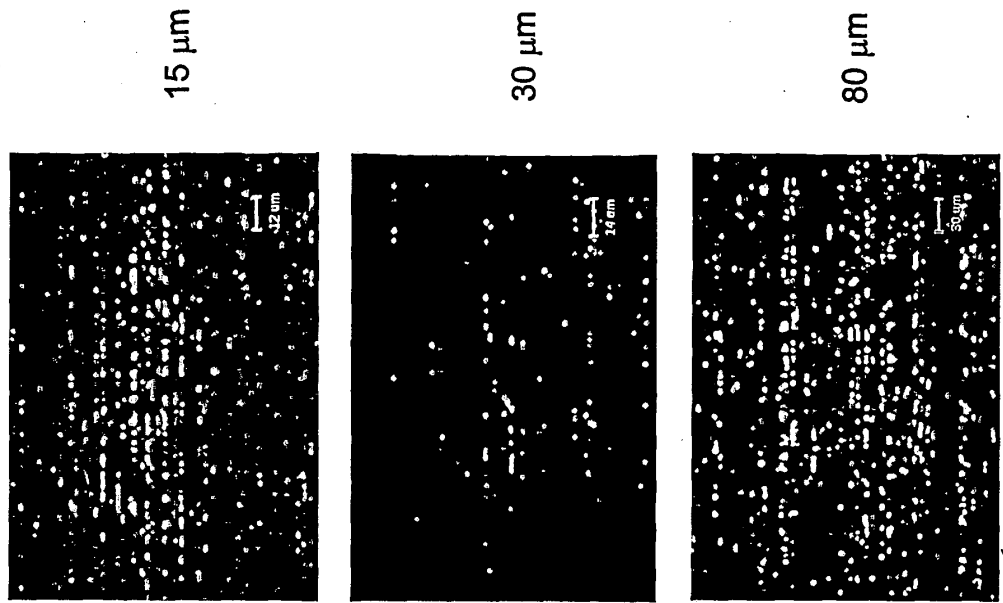
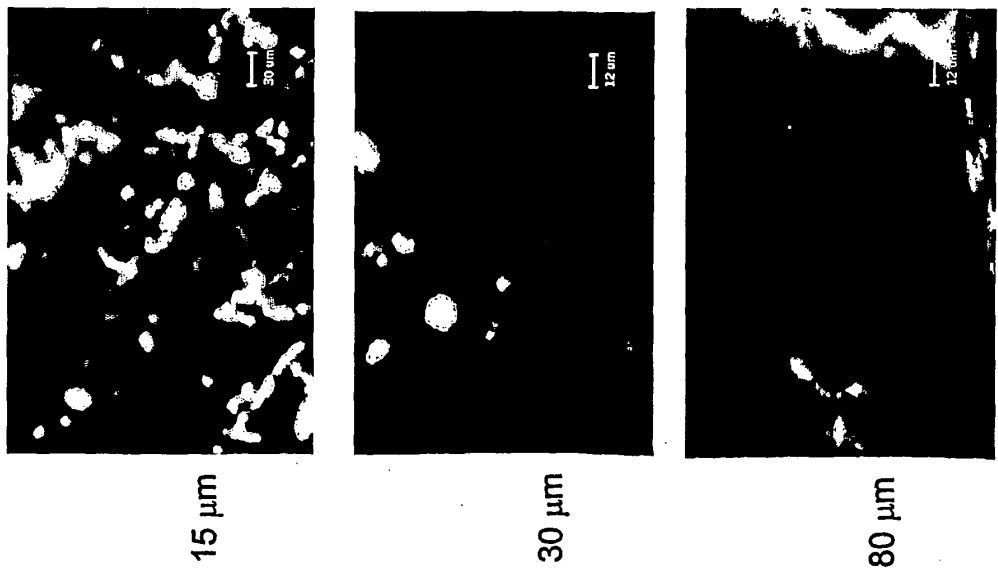


FIG. 9A



10/16

FIG. 10B

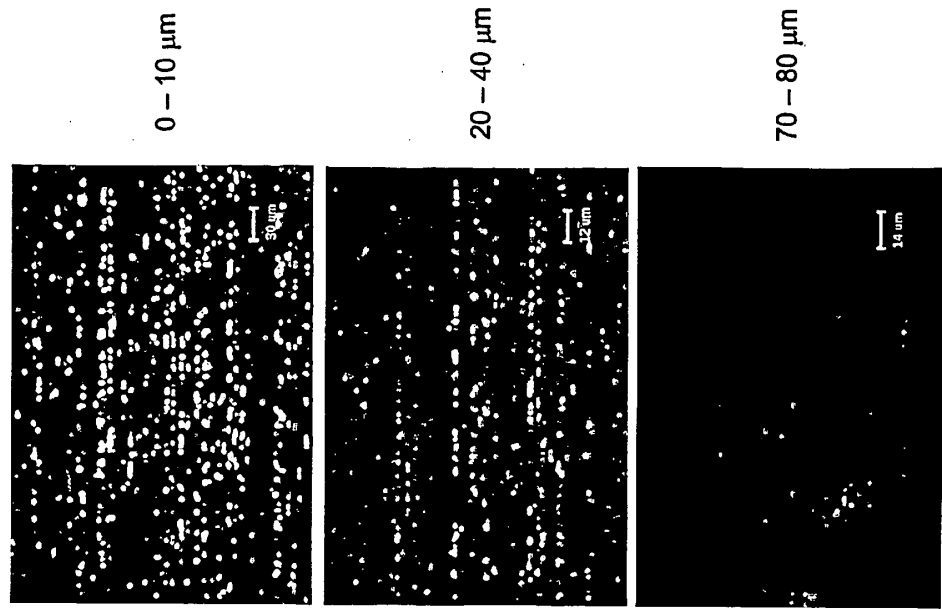


FIG. 10A

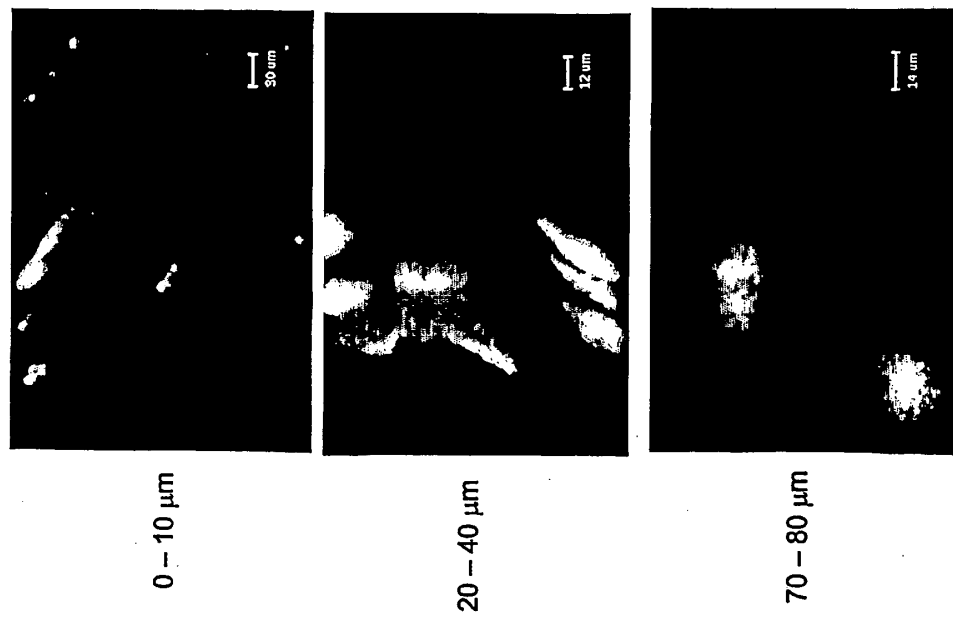


FIG. 11A

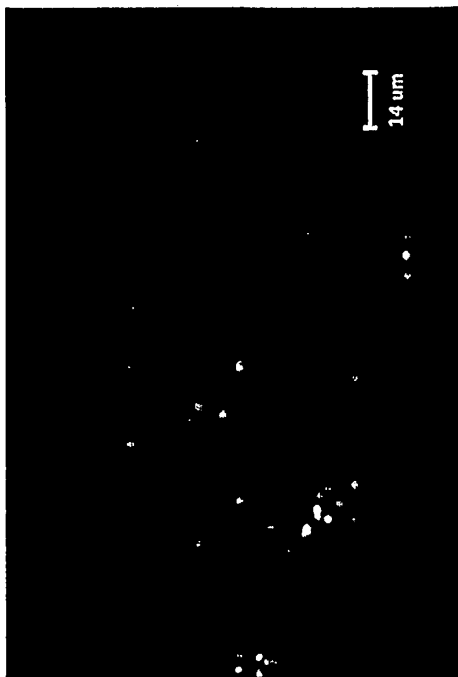
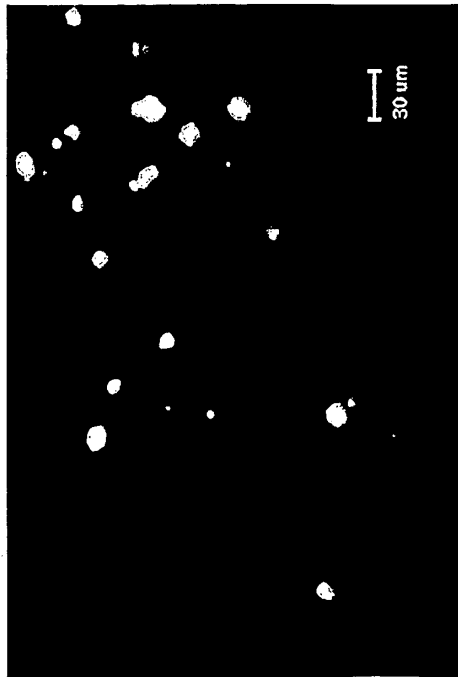


FIG. 11C



FIG. 11B



12/16

FIG. 12

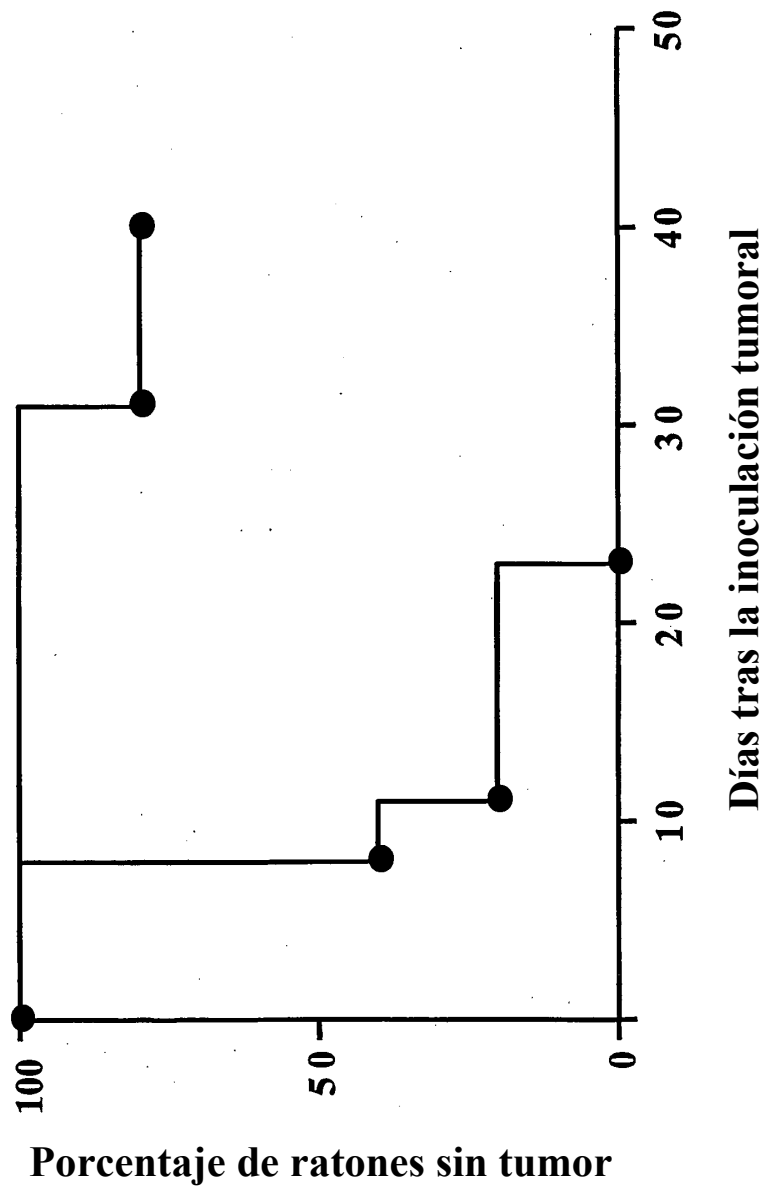


FIG. 13

SFU IFN γ /mill									
	Transcutaneo					Intramuscular			
	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28	
n	6	6	6	4	4	4	4	4	
mediana	76.5	234.0	266.5	132.5	340.5	447.0			
IQR	160	130	280	290	88	486.5			
Tasa de increm. _	3.0	2.6	3.0	3.0	3.8				
Mann-Whitney	$p=0.17$					$p=0.35$			
no paramétrico									

FIG. 14B

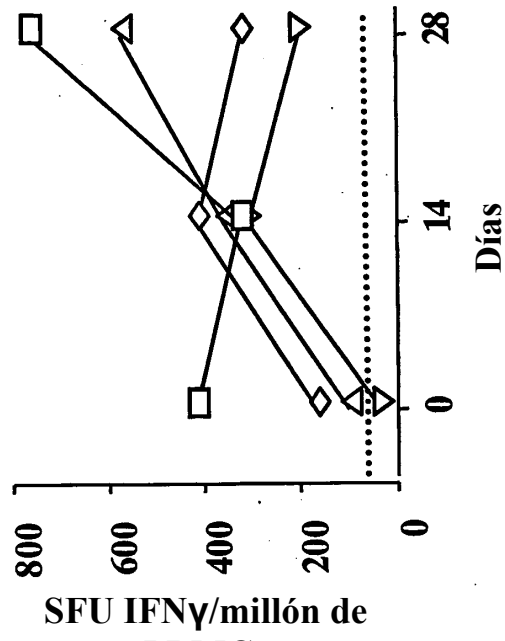
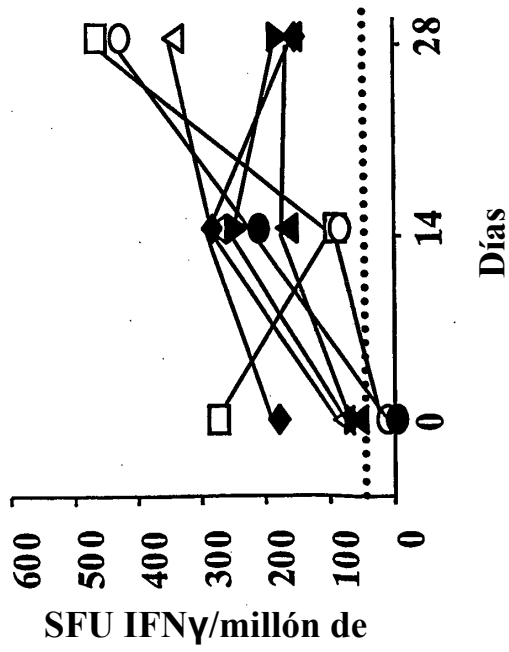


FIG. 14A



15/16

FIG. 15A

	Transcutaneo				Intramuscular			
	% de IFN γ + entre c				% de IFN γ + entre células			
	Día 0	Día 14	Día 28		Día 0	Día 14	Día 28	
n	6	6	6		4	4	4	
Mediana	0.03	0.10	0.12		0.00	0.36	0.16	
IQR	0.1	0.04	0.04		0.18	0.24	0.38	
Respuestas positivas	3/6	6/6	6/6		1/4	4/4	3/4	
Prueba de Mann-Whitney no paramétrica	$p=0.01$				ns			

FIG. 15B

	Transcutaneo				Intramuscular			
	% de IFN γ + entre c				% de IFN γ + entre c			
	Día 0	Día 14	Día 28		Día 0	Día 14	Día 28	
n	6	6	6		4	4	4	
Mediana	0.00	0.06	0.00		0	0	0	
IQR	0.15	0.19	0.17					
Respuestas positivas	1/6	4/6	2/6		0/4	0/4	0/4	
Prueba de Mann-Whitney no paramétrica	ns				ns			

FIG. 16

