

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 310**

51 Int. Cl.:

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2008** **E 08864603 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 2217222**

54 Título: **Composiciones para la vacunación por vía cutánea**

30 Prioridad:

03.12.2007 FR 0759505

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.05.2016

73 Titular/es:

**DBV TECHNOLOGIES (100.0%)
177/181 avenue Pierre Brossolette
92120 Montrouge, FR**

72 Inventor/es:

**RONCO, JORGE;
GODEFROY, SYLVIE y
DUPONT, BERTRAND**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 570 310 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para la vacunación por vía cutánea

La invención se refiere al desarrollo de un método y de un sistema de administración de vacunas por vía cutánea. La invención se refiere más particularmente a la utilización de un dispositivo que comprende un compartimento de condensación para la vacunación epicutánea. La invención se refiere también a protocolos de vacunación epicutánea que permiten la obtención de una respuesta inmune eficaz sin tratamiento de la piel. La invención se puede poner en práctica en cualquier mamífero, preferentemente en el ser humano, para la inducción de una respuesta inmune terapéutica o preventiva contra cualquier tipo de antígeno.

La mayoría de los patógenos penetran en el organismo a través de las mucosas o de la piel. Así, tanto la piel como las mucosas poseen todas las herramientas necesarias para detectar los patógenos y defenderse. Esta línea de defensa comprende principalmente un contingente de células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales residentes. Las únicas CPA presentes en la epidermis en condiciones normales son las células de Langerhans (LC), células dendríticas (DC) derivadas de la médula ósea. Después de la captura del antígeno, las LCs activadas migran en los ganglios linfáticos drenantes en los que inician una respuesta inmune sistémica potente. Así, la piel representa una alternativa potencial al modo de administración por inyección tradicional para el desarrollo de vacunas más eficaces. Además, el sistema inmunitario de la piel puede igualmente ser un blanco ideal para la inducción de una tolerancia en diferentes patologías tales como las enfermedades autoinmunes, las alergias y eventualmente el cáncer.

Sin embargo, la capa córnea (CC), la capa más superficial de la piel, es una barrera fisicoquímica eficaz para la penetración de fluidos, de moléculas grandes (polipéptidos y proteínas), de partículas o incluso de microbios. Así, se han ensayado varias técnicas para intentar obtener una respuesta inmune eficaz por vía epicutánea, es decir por aplicación de un antígeno sobre la piel. Todas estas técnicas implican una alteración física de la capa córnea, por ejemplo por abrasión ligera o moderada (después de la aplicación de bandas adhesivas o utilizando papel de lija), por aplicación de ultrasonidos o de microagujas. Estas diferentes técnicas han demostrado una eficacia en grados diversos, como etapa previa a la aplicación del antígeno, para favorecer su penetración en las capas superficiales de la piel (epidermis), que contiene las células inmunológicas, y la inducción de una respuesta inmune. Así, se ha demostrado que la aplicación conjunta de un antígeno y de un adyuvante como la toxina del cólera (CT) o la toxina lábil de *E. Coli* (LT) sobre una piel previamente raspada es eficaz para la generación de una respuesta inmune de anticuerpo (Glenn G. M., Rao M., Matyas G. R., Alving C. R. Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 1998, 391: 851. Glenn G. M., Scharton-Kersten T., Vassell R., Matyas G. R., Alving C. R. Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants. *Infect Immun.* 1.999, 67: 1.100-6). Por el contrario, la simple hidratación de la piel, previa a la aplicación de un antígeno, seguida o no de un tratamiento oclusivo no ha dado nunca lugar a una respuesta de anticuerpo específica. Esta se obtiene únicamente en el caso de un tratamiento previo de la piel que lleve a la perturbación física de la capa córnea o de la co-administración del antígeno con un adyuvante potente (CT o LT).

Otros trabajos han mostrado a continuación que la utilización de un sistema oclusivo para mantener una formulación de vacuna depositada en forma líquida sobre la piel de animales durante un período que va de 1 a 24 horas, permitía inducir una respuesta inmune en animales y en humanos, pero únicamente después del tratamiento de la piel. Sin embargo, las respuestas inducidas usando un contacto por un período de 0 a 24 horas no varían de forma cualitativa y/o cuantitativa.

En la solicitud WO 2004/030696 se ha considerado inducir una reacción inmunitaria con ayuda de una composición que comprende un antígeno y un compuesto inmunoestimulador, en forma seca, usando un sistema PosIntro o ISCOM.

La utilización de parches dérmicos para obtener una reacción inmunitaria ha sido propuesta igualmente en la solicitud internacional WO 2007/122226. Sin embargo, el método descrito en este documento utiliza un adyuvante.

Así, sin tratamiento físico o fisicoquímico previo (papel de lija, etanol, acetona, banda adhesiva, glicerol) o la utilización de adyuvantes potentes (LT o CT) u otro excipiente facilitador, no se ha detectado ninguna respuesta de anticuerpo específica del antígeno.

La presente invención describe por primera vez un método que permite la inducción de una respuesta inmune específica de antígeno por vía cutánea, sin que sea necesario utilizar un adyuvante (CT o LT) o tratar previamente o perforar la piel. Más particularmente, la invención describe un método de vacunación epicutánea, eficaz incluso en ausencia de adyuvante, que se basa en la utilización de una formulación de vacuna seca aplicada sobre la piel en condiciones que permiten la formación de un compartimento de condensación. La invención muestra que la creación y el mantenimiento de una hidratación de la piel inducen una perturbación de la CC que permite el paso de antígenos. Además, el agua acumulada en el sistema de liberación permite también que la formulación de vacuna seca se rehidrate y se solubilice, y que entre en contacto con la piel. Se ha demostrado en ensayos preclínicos que la invención permitía, contrariamente a los diferentes sistemas cutáneos descritos hasta ahora, inducir una respuesta inmune de anticuerpo específica del inmunógeno, sin co-administración de adyuvante (del tipo CT o LT) ni

preparación (abrasión o perforación) de la piel. De forma particularmente sobresaliente, la invención permite la transferencia cutánea de macromoléculas (principalmente de polipéptidos y proteínas) sin ningún tratamiento activo, lo que no habías sido nunca descrito en el estado de la técnica. Como se muestra en los ejemplos, se ha observado una respuesta inmune particularmente fuerte después de tres aplicaciones de la vacuna según el procedimiento de la invención.

Un objetivo de la invención se refiere por lo tanto a la utilización de una formulación de vacuna para la preparación de una composición para la vacunación epicutánea de un mamífero, preferentemente un humano, caracterizada por que la formulación de vacuna está en forma seca y desprovista de adyuvante, y por que se administra por aplicación sobre la piel del mamífero por medio de un dispositivo cutáneo que forma en contacto con la piel un compartimento de condensación que posee un volumen comprendido entre 1 y 300 mm³/cm² de superficie del dispositivo, conteniendo dicho dispositivo una cantidad de formulación de vacuna comprendida entre 0,1 µg y 500 µg por cm² de superficie, manteniéndose el dispositivo sobre la piel durante un periodo de 6 a 72 horas, e induciendo dicha aplicación de la formulación en forma seca y desprovista de adyuvante sobre la piel intacta una respuesta inmune específica de antígeno caracterizada por la producción de anticuerpos del tipo IgG.

La descripción se refiere igualmente a la utilización de un dispositivo de administración cutánea para la preparación de una composición destinada a la administración de una formulación de vacuna que comprende un antígeno, sin tratamiento previo de la piel ni co-administración de adyuvante, conteniendo el dispositivo de administración cutánea la formulación de vacuna en forma seca sin compuesto adyuvante, y formando en contacto con la piel un compartimento de condensación que contiene la formulación de vacuna, permitiendo así la penetración del antígeno en la epidermis y la inducción de una respuesta inmune en ausencia de adyuvante o de tratamiento previo de la piel.

La descripción se refiere igualmente a la utilización de un dispositivo de administración cutánea para la administración de una formulación de vacuna que comprende un antígeno, sin tratamiento previo de la piel ni co-administración de adyuvante, conteniendo el dispositivo de administración cutánea la formulación de vacuna en forma seca sin compuesto adyuvante, y formando en contacto con la piel un compartimento de condensación que contiene la formulación de vacuna, permitiendo así la penetración del antígeno en la epidermis y la inducción de una respuesta inmune en ausencia de adyuvante o de tratamiento previo de la piel.

La descripción se refiere igualmente a un método para inducir una respuesta inmune específica de antígeno en un mamífero, comprendiendo el método la aplicación sobre la piel del mamífero, sin tratamiento previo de la piel, de un dispositivo de administración cutánea que contiene una formulación de vacuna en forma seca que comprende el antígeno sin compuesto adyuvante, formando el dispositivo en contacto con la piel un compartimento de condensación que contiene la formulación de vacuna, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la penetración del antígeno en la epidermis y la inducción de una respuesta inmune en ausencia de adyuvante o de tratamiento previo de la piel.

La descripción se refiere igualmente a un método para inducir por vía cutánea una respuesta inmune específica de antígeno, comprendiendo el método la creación y el mantenimiento de una hidratación local de la piel y la puesta en contacto de la piel hidratada con una formulación de vacuna seca desprovista de adyuvante, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la penetración del antígeno y la inducción de una respuesta inmune.

La descripción se refiere igualmente a un método para inducir una respuesta inmune sistémica contra un antígeno proteico en un sujeto, comprendiendo el método la administración de dicho antígeno a dicho sujeto por vía epicutánea por medio de un dispositivo cutáneo que comprende una pared de fondo (*backing*), estando adaptada la parte periférica de dicha pared del fondo para crear con la piel una cámara hermética, en la que la pared de fondo mantiene dicho antígeno sobre su cara en contacto con la piel, en el interior de la cámara, siendo dicho antígeno extraído de la pared del fondo después de la aplicación del dispositivo sobre la piel y a continuación administrado al sujeto por vía epicutánea, llevando dicha administración a la inducción de una respuesta inmune sistémica en el sujeto.

En un modo de realización particular, la parte periférica de la pared del fondo del dispositivo cutáneo posee propiedades adhesivas sobre la piel húmeda.

En otro modo de realización de la invención, la respuesta inmune sistémica inducida después de la administración de un antígeno por medio de un dispositivo cutáneo, comprende una respuesta humoral.

En un modo de realización preferido, se forma una condensación en el interior de la cámara después de la aplicación del dispositivo cutáneo sobre la piel, causando o aumentando dicha condensación el desplazamiento y la liberación epicutánea del antígeno. En particular, esta condensación puede estar formada debido a la transpiración.

La descripción se refiere igualmente a un método para inducir una respuesta inmune sistémica contra un antígeno proteico en un sujeto, en la que dicho antígeno está en forma seca o en forma de partículas. Más particularmente, el antígeno puede estar unido al soporte sin adhesivo por medio de fuerzas electrostáticas y/o de fuerzas de Van der Waals o por medio de un revestimiento adhesivo sobre el soporte.

El antígeno puede aplicarse sobre el soporte por medio de un procedimiento de pulverización/secado. Dicho antígeno se puede igualmente disolver o dispersar en un líquido, en este caso se mantiene sobre el soporte en un depósito de material absorbente.

5 La descripción se refiere igualmente a la utilización de una formulación de vacuna en forma seca para la preparación de un medicamento para la inducción de una respuesta inmune en un mamífero, caracterizada por que la formulación de vacuna se aplica por medio de un dispositivo cutáneo sin compuesto adyuvante sobre la piel no tratada del mamífero, durante un periodo de aproximadamente 48 horas.

10 La descripción se refiere igualmente a la utilización de una formulación de vacuna en forma seca para la inducción de una respuesta inmune en un mamífero, caracterizada por que la formulación de vacuna se aplica por medio de un dispositivo cutáneo sin compuesto adyuvante sobre la piel no tratada del mamífero, durante un periodo de aproximadamente 48 horas.

La descripción se refiere igualmente a un método para la inducción de una respuesta inmune en un mamífero, que comprende la aplicación de una formulación de vacuna en forma seca por medio de un dispositivo cutáneo sin compuesto adyuvante sobre la piel no tratada de un mamífero, durante un periodo de aproximadamente 48 horas.

15 La descripción se refiere igualmente a un dispositivo cutáneo que comprende una pared de fondo (*backing*), estando adaptada la parte periférica de dicha pared del fondo para crear con la piel una cámara hermética, en la que la pared de fondo mantiene dicho antígeno sobre su cara en contacto con la piel, en el interior de la cámara, siendo dicho antígeno extraído de la pared de fondo después de la aplicación del dispositivo sobre la piel y a continuación administrada al sujeto por vía epicutánea.

20 La descripción se refiere igualmente a una composición de vacuna, caracterizada por que comprende un dispositivo de administración cutánea que forma un compartimento de condensación después de la aplicación sobre la piel de un sujeto, comprendiendo dicho compartimento una formulación de vacuna en forma seca y desprovista de cualquier compuesto adyuvante.

25 La invención se produce por el descubrimiento inesperado de que se puede inducir una respuesta inmune por vía cutánea sobre piel intacta (es decir, sin tratamiento perforante o por abrasión física y/o química) y sin utilización de adyuvante. Este efecto se ha obtenido usando una formulación de vacuna en forma seca y aplicándola por medio de un dispositivo que forma un compartimento de condensación cuando se aplica sobre la piel y/o durante un periodo de tiempo adaptado.

30 Sin estar sujeto a un mecanismo de acción particular, se propone que la hidratación de la piel permite el hinchamiento de los corneocitos de la capa córnea, así como la integración de las moléculas de agua entre los dominios lipídicos de los espacios intercelulares. Esta hidratación induciría además una perturbación de la homeostasis cutánea traduciéndose, entre otras, por modificaciones del perfil de las citosinas producidas, alteraciones morfológicas y fenotípicas de las células de Langerhans o bien incluso por el aumento del número de células mononucleadas en la epidermis.

35 A pesar de su papel de barrera, se establece a través de la piel entre el organismo y la atmósfera, y en condiciones fisiológicas, un flujo de agua dirigido hacia la atmósfera. Este flujo se conoce con el nombre de pérdida insensible de agua (PIA). El procedimiento de la invención, que pone en realización un compartimento de condensación, contribuye a aislar una parte de la piel del medio que lo rodea. En el transcurso de este fenómeno, se perturban los intercambios de vapor de agua entre el cuerpo y la atmósfera, lo que llevaría a la acumulación del agua en el compartimento y también a un aumento de la hidratación de la piel, de toda la epidermis y en particular de la capa cornea (*stratum corneum*) que constituye la principal barrera a la absorción de sustancias. Los resultados sugieren que, en los humanos, el gran flujo de agua medido después de la retirada del compartimento de condensación refleja la evaporación del agua acumulada en la superficie cutánea. El compartimento de condensación del dispositivo lleva, según el tiempo, a la saturación en vapor de agua (proveniente de la PIA) del volumen del
40 compartimento, y después a la condensación, llegando a un estado de equilibrio. En efecto, al principio de la aplicación, este volumen no está saturado en vapor de agua, ya que contiene aire ambiente. Una vez que se alcanza la saturación de la atmósfera, el agua en estado de vapor podría entonces condensarse en forma de agua líquida. Esta condensación sería entonces alimentada por el flujo de agua residual proveniente de la piel. En estas condiciones, se obtiene un estado de equilibrio que produce la acumulación de agua en el dispositivo estanco (véase la figura 1B).
45
50

La invención permite así resolver los inconvenientes de los métodos de vacunación epicutánea de la técnica anterior, proponiendo un método utilizable con cualquier tipo de antígeno, compatible con la producción de dispositivos preparados para el uso, y que no necesita tratamiento de la piel. La gran hidratación inducida en la epidermis, con acumulación de agua en y sobre la superficie del *stratum corneum*, permite modular el coeficiente de reparto entre las moléculas de la vacuna y la piel en presencia de agua, hinchar los corneocitos o también alterar la organización de la fase lipídica intercelular. Esta modificación permite la disolución del principio activo en los líquidos presentes en la superficie de la piel y su paso (por difusión pasiva) a través de la piel, sin que sea necesario perforar o raspar la piel.
55

La invención se puede realizar con cualquier dispositivo de administración cutánea que forme un compartimento de condensación. Se trata preferentemente de dispositivos del tipo parche, sellos o apósitos, preferentemente parches. El dispositivo según la invención es típicamente de naturaleza transdérmica con difusión pasiva, es decir que no contiene medios para producir una perforación o una abrasión de la piel. Se trata ventajosamente de un dispositivo de tipo parche oclusivo, como por ejemplo un parche electrostático producido según la tecnología VIASKIN® descrita en la solicitud de patente WO02/071950.

En el sentido de la invención se denomina compartimento al espacio dejado libre entre la piel y el fondo ("*backing*") del dispositivo después de la aplicación del dispositivo sobre la piel, no estando este *backing* pegado sobre la piel y dejando así sitio para la acumulación de una pequeña cantidad de agua sobre la piel (véanse por ejemplo las figuras 1A y 1B). Los resultados obtenidos muestran que la utilización de un compartimento de condensación ahora, durante la duración de la aplicación, cierto grado de hidratación debido a la expresión natural de líquido por la piel en dirección del compartimento, permite el paso de antígenos macromoleculares y la inducción de una respuesta específica. Estos resultados son particularmente sorprendentes teniendo en cuenta los datos de la técnica anterior que subrayan la necesidad de recurrir a adyuvantes particulares y a un tratamiento de la piel para obtener una respuesta satisfactoria.

En la invención, el dispositivo es tal que forma, en contacto con la piel, un compartimento de condensación que tiene un volumen comprendido entre 1 y 300 mm³ por cm² de superficie del dispositivo. Dicho volumen corresponde a una altura del compartimento que va de 0,01 mm a 3 mm aproximadamente. En un modo más preferido, el volumen del compartimento está comprendido entre 2 y 200 mm³ por cm² de superficie del dispositivo, todavía más preferentemente entre 2 y 100 mm³ por cm² de superficie del dispositivo, que corresponde a una altura de 0,02 a 1 mm aproximadamente. La superficie de difusión sobre la piel del dispositivo puede ser adaptada por el experto en la técnica y está típicamente comprendida entre 0,2 y 5 cm², más generalmente entre 0,5 y 3 cm².

No es necesario que las paredes del compartimento de condensación (el *backing* del dispositivo) sean totalmente impermeables. Por el contrario, cierta permeabilidad al vapor de agua en las condiciones normales de temperatura y de presión es aceptable, como es el caso para los polietilenos, puesto que esta evaporación no impide el mantenimiento de una atmósfera saturada en vapor de agua, gracias a la presencia de agua líquida en el compartimento.

En un modo particular de realización, las paredes del compartimento de condensación comprenden un material que presenta un grado de permeabilidad inferior a 15 g/m²/24 horas, preferentemente inferior a 10 g/m²/24 horas, por ejemplo del orden de 9 g/m²/24 horas, aproximadamente.

Dichos materiales pueden ser elegidos, por ejemplo, entre los polímeros, copolímeros, plásticos, cerámicas, cualquier material biocompatible (por ejemplo, el grafito), etc. Ejemplos de polímeros biocompatibles son principalmente el polietileno (PE), policarbonato, poliéster (PET), los plásticos celulósicos (CA, CP), el cloruro de polivinilo (PVC), el polimetilmetacrilato (PMMA), el poliuretano (PUR), las siliconas (PTFE) o el polifluoruro de vinilideno (PVDF). Ejemplos de copolímeros biocompatibles son principalmente el copolímero de etileno-acetato de vinilo (EVA).

Como ejemplos de polímeros que presentan grados de permeabilidad al vapor de agua (abreviado generalmente como MVTR por sus iniciales en inglés *moisture vapor transmission rate*) compatibles con la presente invención, se pueden citar principalmente el CoTran® 9706 (MVTR = 26,4 g/m²/24 horas), el CoTran® 9720 (MVTR = 9,4 g/m²/24 horas) y el CoTran® 9722 (MVTR = 7,9 g/m²/24 horas).

En un modo de realización preferido, el compartimento de condensación está formado por un disco en polímero, por ejemplo en polietileno, de forma esencialmente circular (el *backing*) y de diámetro comprendido entre 2 y 100 mm aproximadamente, preferentemente entre 5 y 70 mm aproximadamente, que está fijado (por ejemplo, pegado) sobre un anillo de material biocompatible, por ejemplo en polietileno, que presenta un diámetro exterior esencialmente idéntico al del disco y un diámetro interno comprendido entre 1 y 50, preferentemente entre 2 y 20 mm aproximadamente. El espesor del disco y el del anillo están comprendidos, por ejemplo, entre 0,01 y 2 mm aproximadamente, lo que define un compartimento de una altura comprendida entre 0,01 y 2 mm, siendo el volumen del compartimento pequeño pero nunca nulo, incluso si la flexibilidad del *backing* determina en algunos lugares un contacto de este último con la piel. El disco puede estar fijo sobre el anillo por cualquier medio adaptado. Típicamente, el anillo es adhesivo o se hace adhesivo para permitir su fijación al disco.

Como se muestra en la figura 1A, un prototipo particular de dispositivo según la invención está compuesto por:

- un anillo [1] de material biocompatible, de diámetro variable y de altura de 0,01 a 2 mm aproximadamente, dependiente del volumen del compartimento de condensación por cm² de superficie. En el modo representado en la figura 1A, el anillo es adhesivo por su cara externa al menos, destinado a entrar en contacto con la piel;
- un disco [2] de material biocompatible, que hace las veces de límite superior del compartimento (contenedor del principio activo en forma seca), pegado sobre el anillo (por ejemplo, por medio de un adhesivo). La

superficie del disco es típicamente de 5 mm de diámetro mínimo. El MVTR (*moisture vapor transmission*) del disco ("*backing*") es preferentemente inferior a 10 g/m²/24 horas);

- una arandela [3] de "*release liner*" que protege la superficie adhesiva del anillo y destinada a ser pelada antes de la aplicación sobre la piel. Esta arandela es ventajosamente un disco que recubre el

El compartimento formado por el dispositivo es un compartimento de condensación que tiene propiedades de hidratación. El poder hidratante se traduce por la capacidad de actuar sobre la integridad de la epidermis bajo el compartimento de condensación del dispositivo induciendo un aumento del grado de hidratación de la epidermis, ventajosamente desde la primera hora de aplicación sobre la piel, que va de 30% a 100% y más precisamente de 50% a 70%. Preferentemente, el poder hidratante del compartimento de condensación debe ser tal que permite inducir, en la superficie externa de la epidermis y en el compartimento de condensación del dispositivo, un aumento de la cantidad relativa de agua que va de 40% a más de 100% a partir de la primera hora de aplicación y, más preferentemente, superior a 50%.

En un modo de realización preferido, el dispositivo se mantiene sobre la piel por medios que aseguran un estanqueidad al compartimento de condensación. A este efecto puede utilizarse cualquier medio adhesivo, incluidos materiales del tipo goma, polímero o plástico que tengan un gran poder adhesivo.

La invención presenta la ventaja de permitir la vacunación incluso sobre la piel intacta, es decir una piel que no haya sufrido tratamiento particular. En el sentido de la invención, se entiende por tratamiento de la piel cualquier tratamiento abrasivo o perforante que lleve a una destrucción al menos parcial de la capa superficial al menos de la piel.

Por otra parte, otra ventaja de la invención es que permite obtener una respuesta inmune importante, incluso sin co-administración de adyuvante. El término adyuvante denomina, en el sentido de la invención, cualquier compuesto que ejerza una acción fisicoquímica y/o biológica sobre la piel, facilitando la penetración del antígeno en la piel, y que aumente la respuesta inmunitaria contra el antígeno. Por acción fisicoquímica y/o biológica, el adyuvante, tal como se define en la presente memoria, es un compuesto que altera la permeabilidad de la epidermis por perturbación de la capa córnea, permitiendo así el paso del antígeno y su contacto con las células inmunológicamente activas de la epidermis. Ejemplos de compuestos adyuvantes son principalmente la toxina del cólera (CT) o la LT (toxina termolábil de *E. coli*). Otros ejemplos son las transfersomas descritas por Paul *et al.* (Paul A., Cevc G., Bachlawat B. K. Transdermal immunization with large proteins by ultradeformable drug carriers, *Eur. J. Immunol.* 1995, 25 (12): 3521-4), que permiten transportar un antígeno en las membranas.

La invención se puede realizar con cualquier formulación de vacuna en forma seca. El término formulación de vacuna denomina cualquier formulación que contiene elementos antigénicos. Se trata típicamente de una formulación que comprende uno o varios antígenos, por ejemplo de naturaleza peptídica, polipeptídica (o proteica), lipídica y/o sacarídica, o mezclas sencillas o conjugados químicos de estos compuestos. Una formulación de vacuna preferida comprende una o varias moléculas antigénicas: moléculas con una masa molecular superior a 500 Da, la mayoría de las veces polipéptidos y proteínas superiores a 1.500 Da que tengan una actividad o un objetivo de vacuna preventiva o terapéutica, o moléculas con una masa molecular superior a 500 Da destinadas a una acción local (terapéutica) sobre la epidermis. Típicamente, la formulación de vacuna comprende al menos un antígeno de naturaleza peptídica o polipeptídica. Puede tratarse, por ejemplo, de antígenos bacterianos, antígenos virales, antígenos tumorales, etc. como por ejemplo un antígeno del virus de la gripe, un antígeno del virus de la hepatitis (o C), un antígeno de *Haemophilus Influenzae*, un antígeno del virus respiratorio sincitial, un antígeno de salmonella (*Shigella*) o de tuberculosis (*Tiphy*), o también antígenos característicos de enfermedades autoinmunes, cáncer, enfermedad de Alzheimer, alergias, etc. La formulación de vacuna puede comprender además cualquier excipiente o vehículo adaptado a un uso farmacéutico, así como cualquier compuesto con actividad inmuno-moduladora, como por ejemplo una citocina, un compuesto ligando de receptores Toll, etc.

La formulación de vacuna realizada se presenta en "forma seca", es decir en una forma deshidratada y principalmente una forma de polvo, partículas, aglomerantes, torta, forma desecada, etc. La forma seca se puede obtener por liofilización o por simple evaporación.

En un modo de realización particular, la formulación de vacuna está en forma de polvo.

En otro modo de realización particular, la formulación de vacuna se mantiene sobre una superficie del dispositivo, típicamente sobre el *backing* del compartimento, por fuerzas de naturaleza química o fisicoquímica, en ausencia de material adhesivo sobre esta superficie. Preferentemente, la formulación de vacuna se mantiene sobre una superficie del dispositivo, típicamente sobre el *backing* del compartimento, por fuerzas electrostáticas o fuerzas de Van der Waals.

En la invención, el dispositivo contiene una cantidad de formulación de vacuna comprendida entre 0,1 µg/cm² y 500 µg/cm², preferentemente entre 20 µg y 300 µg por cm², más preferentemente entre 20 µg y 100 µg por cm². Se entiende que esta cantidad puede ser adaptada por el experto en la técnica en función de los objetivos, de la patología, de la duración del tratamiento, del sujeto, etc.

La invención permite inducir una respuesta inmune significativa, incluso en ausencia de adyuvante y de tratamiento de la piel. La invención se puede utilizar para la vacunación preventiva o terapéutica contra cualquier tipo de agente patógeno (virus, parásitos, bacterias, proteínas, etc.) contra células tumorales o contra antígenos de uno mismo o tratamientos de individuos alérgicos. Los resultados presentes muestran la inducción de una respuesta específica de antígeno, principalmente una respuesta de anticuerpos del tipo IgG.

La amplitud de la respuesta inmune puede ser adaptada modificando los tiempos de colocación del dispositivo y/o procediendo a aplicaciones repetidas. Como se ilustra en los ejemplos, la respuesta inmune inducida, después de tres aplicaciones de la vacuna de solamente 6 horas, es equivalente a la observada para una duración de aplicación de 24 horas (ejemplo 2). Se ha demostrado también que una hidratación mantenida durante periodos que van de 6 horas a 24 horas era suficiente para desarrollar una respuesta inmunitaria, incluso sin tratamiento previo de la piel ni co-administración de adyuvante.

Por otra parte, se ha prolongado igualmente el periodo de aplicación a 48 y a 72 horas (ejemplo 5). Los resultados obtenidos muestran que el tiempo de 48 horas da resultados sorprendentes ya que la respuesta de anticuerpo específica aumenta casi un orden de magnitud con respecto al tiempo de colocación de 24 horas. Una aplicación mantenida más allá de 48 horas, por ejemplo un tiempo de colocación de 72 horas, parece que no contribuye a aumentar más la respuesta de anticuerpo.

En un modo de realización preferido, la invención comprende la aplicación sucesiva al sujeto de dos dispositivos al menos, preferentemente tres al menos, estando cada aplicación espaciada de 7 a 30 días aproximadamente, preferentemente de 10 a 20 días, típicamente aproximadamente 15 días.

Preferentemente para cada aplicación el dispositivo se mantiene sobre la piel durante un periodo de 6 a 72 horas aproximadamente, preferentemente de 6 a 48 horas aproximadamente, más preferentemente 48 horas aproximadamente.

Un protocolo particularmente preferido para la inducción de una respuesta inmune comprende tres aplicaciones sucesivas al menos de un dispositivo, durante un periodo de 48 horas aproximadamente, estando espaciada cada aplicación aproximadamente 15 días.

En la parte anterior, el término "aproximadamente" denomina una variación de + o - 10% con respecto al valor dado.

La invención muestra también que se obtiene una respuesta de anticuerpo grande por vacunación epicutánea sobre piel intacta cuando la formulación de vacuna esta en forma seca y se aplica durante uno o varios periodos de 48 horas aproximadamente, preferentemente durante periodos repetidos de 48 horas aproximadamente.

La invención es utilizable para la vacunación contra cualquier antígeno a cualquier mamífero. Se puede realizar en niños o adultos, es esencialmente no invasiva y no necesita del empleo de adyuvantes.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención aparecerán mediante la lectura de los ejemplos siguientes que se deben considerar como ilustrativos y no limitativos.

Leyenda de las figuras

Figura 1: **A.-** Esquema del dispositivo cutáneo con compartimento de condensación: [1] anillo de material biocompatible, [2] disco del "backing" pegado mediante un adhesivo de doble cara sobre el disco, [3] arandela de *release liner* para ser pelada antes de la aplicación, que protege al adhesivo. **B.-** Esquema de los flujos de vapor de agua en el compartimento de condensación.

Figura 2: Inducción de una respuesta inmune de anticuerpo específica del antígeno por vía epicutánea sobre la piel intacta, sin co-administración de adyuvantes usando un dispositivo que contiene un compartimento de condensación.

Figura 3: Inducción de una respuesta inmune de anticuerpo anti-ovoalbúmina por vía epicutánea después de 6 ó 24 horas de aplicación sobre la piel de un dispositivo que contiene un compartimento de condensación.

Figura 4: Relación entre la cantidad de vapor de agua que entra en el compartimento y la cantidad de agua condensada en función del tiempo: ■: cantidad de agua acumulada en el compartimento y ♦: cantidad de agua condensada en el compartimento.



Cantidad de agua en estado de vapor después de 20 horas.



Cantidad de agua que ha condensado después de 20 horas.

Figura 5: Aumento del porcentaje de hidratación de las diferentes capas de la epidermis (superficial, superficial y media, epidermis entera) en función del tiempo de aplicación del dispositivo que contiene el compartimento de condensación.

5 Figura 6: Aumento de la cantidad de agua acumulada en la superficie de la piel en función del tiempo de aplicación del dispositivo que contiene el compartimento de condensación.

Figura 7: Potenciación de la respuesta inmune de anticuerpo anti-ovoalbúmina inducida por vía epicutánea prolongando la duración de aplicación del dispositivo que contiene un compartimento de condensación sobre la piel.

Figura 8: Inducción de una respuesta inmune de anticuerpo potente específica del inmunógeno por vía epicutánea sin compuesto adyuvante ni tratamiento perforante o abrasivo de la piel en comparación con un sistema de parche.

10 Figura 9: Inducción de una respuesta inmune de anticuerpo anti-TT por vía epicutánea sin compuesto adyuvante con dosis pequeñas de antígeno.

Figura 10: Inducción de un espesamiento de la epidermis, con respecto a una ruptura de la homeostasis cutánea, proporcional a la prolongación de la duración de aplicación del dispositivo que contiene un compartimento de condensación sobre la piel.

15 Figura 11: Inducción de la penetración del antígeno en la piel y de la absorción por las células dendríticas, proporcionales a la prolongación de la duración de aplicación del dispositivo que contiene un compartimento de condensación sobre la piel.

20 Figura 12: Inducción de la modificación de la red de células de Langerhans epidérmicas, con respecto a una activación de estas células, proporcional a la prolongación de la duración de aplicación del dispositivo que contiene un compartimento de condensación sobre la piel.

Figura 13: Inducción de la producción de anticuerpos específicos de un antígeno tumoral capaces de dirigir *in vitro* las células que expresan este antígeno después de aplicaciones de 24 horas sobre la piel de un dispositivo que contiene un compartimento de condensación cargado con el antígeno tumoral.

25 Figura 14: Inducción de una protección parcial contra una infección por el virus respiratorio sincitial (VRS) de crías de ratón después de una aplicación de 48 horas sobre la piel de un dispositivo que contiene un compartimento de condensación cargado con un antígeno del VRS.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un dispositivo cutáneo que contiene un compartimento de condensación

30 Se han preparado dispositivos de aplicación cutánea que poseen un compartimento de condensación usando como "backing" una película de polietileno (origen 3M) que está recubierta con un anillo de espuma, que da la altura deseada al compartimento, hecho adhesivo en sus dos caras (espesor = 0,7 mm). Este dispositivo presenta así una superficie de difusión sobre la piel de 1 cm² y un compartimento de expansión del aire difundido a través de la piel de 70 mm³ (véase la figura 1A).

35 Se han usado varios polímeros que presentan diferentes permeabilidades al vapor de agua (MVTR: *moisture vapor transmission rate*), principalmente el CoTran® 9706 (MVTR = 26,4 g/m²/24 horas), el CoTran® 9720 (MVTR = 9,4 g/m²/24 horas) y el CoTran® 9722 (MVTR = 7,9 g/m²/24 horas).

Ejemplo 2: Inducción de una respuesta inmune de anticuerpo específica del antígeno por vía epicutánea sin compuesto adyuvante ni tratamiento perforante o abrasivo de la piel.

40 Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de 10 mm³/cm², cargados con un antígeno modelo ovoalbúmina (OVA), toxina tetánica (TT), un antígeno tumoral o una vacuna comercial contra la gripe, en forma seca, se han aplicado durante 24 horas en el lomo de ratones BALB/c hembras (n = 6 a 10), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones. Las aplicaciones han sido renovadas 2 y 4 semanas después de las primeras. Los anticuerpos anti-antígenos del tipo IgG totales han sido dosificados por ELISA en los sueros de los animales extraídos 2 semanas después de la última aplicación. Los resultados presentados en la figura 2 se expresan en título de anticuerpo específico del antígeno. Se trata para el suero de cada animal de la inversa de la dilución a la que la absorbancia medida a 450 nm es igual al punto de corte determinado a partir del suero de ratones no tratados. Los resultados obtenidos muestran la inducción de una gran respuesta inmune específica de antígeno, y esto sin que se haya utilizado ningún adyuvante.

Ejemplo 3: Inducción de una respuesta inmune de anticuerpo anti-ovoalbúmina por vía epicutánea sin compuesto adyuvante después de 6 ó 24 horas de aplicación sobre la piel intacta

- Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de $10 \text{ mm}^3/\text{cm}^2$, cargados con OVA ($100 \mu\text{g}$) en forma seca, se han aplicado durante 6 ó 24 horas en el lomo de ratones BALB/c hembras ($n = 10$), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones. Las aplicaciones han sido renovadas 2 y 4 semanas después de las primeras. Los anticuerpos anti-antígenos del tipo IgG totales han sido dosificados por ELISA en los sueros de los animales extraídos 2 semanas después de la última aplicación. Los resultados presentados en la figura 3 se expresan en título de anticuerpo específico del antígeno. Se trata para el suero de cada animal de la inversa de la dilución a la que la absorbancia medida a 450 nm es igual al punto de corte determinado a partir del suero de ratones no tratados. Los resultados obtenidos muestran la inducción de una gran respuesta inmune específica de antígeno después de tiempos de colocación de 6 ó 24 horas.

Ejemplo 4: Estudio de la cantidad y del estado físico del agua disponible en el compartimento de condensación

- La piel deja evaporar una cantidad fisiológica de vapor de agua. Esta evaporación se expresa mediante la PIA. Provoca un aumento de la cantidad de vapor de agua en el compartimento de condensación. El aumento de la cantidad de vapor provoca a su vez un aumento de la presión parcial de vapor de agua en el compartimento. A partir de una presión de $53,75 \text{ mbares}$ a 35°C , el compartimento está en condición de saturación. Más allá de esta presión, el vapor se condensa en agua líquida que se deposita en la superficie de la piel y puede llenar el compartimento de condensación. Por otra parte, en la composición del compartimento de condensación, el polímero del *backing* utilizado en este ejemplo no es totalmente impermeable y deja escapar una cierta cantidad de vapor definida por su permeabilidad al vapor de agua (*moisture vapor transmission rate*, MVTR).

- Así, en este sistema, existe un equilibrio entre por una parte la cantidad de agua que entra en el compartimento en forma de vapor de agua y la que sale de él, bien por transmisión a través de la película polimérica o bien por condensación. Estas diferentes cantidades han sido evaluadas de la forma siguiente:

$$\begin{aligned} Q_1 &= \text{PIA} \cdot S \cdot t \\ Q_2 &= \text{MVTR} \cdot S' \cdot t \\ Q &= Q_1 - Q_2 \\ P &= nRT/V \end{aligned}$$

- Siendo Q_1 = masa de vapor de agua cada vez que entra en el compartimento; Q_2 = cantidad de vapor de agua que se escapa del polímero; Q = cantidad de vapor de agua que queda en el compartimento; P = presión en el compartimento; S = superficie de liberación del vapor de agua a través de la piel; S' = superficie de liberación del vapor de agua a través del polímero; t = tiempo.

- Las cantidades de agua antes y después de 20 horas de aplicación del compartimento de condensación han sido evaluadas por medidas de PIA en pieles extraídas de lomos de ratas sin pelo. Las determinaciones han sido realizadas en comparación con las zonas de la piel no sometidas al dispositivo. Los fragmentos de piel han sido montados en células de difusión de Franz. En el compartimento receptor, un tampón de PBS pH = 7,4 permite conservar la piel en un estado de hidratación comparable con el estado fisiológico. Cuando las células de Franz están preparadas, se colocan en un baño maría a 37°C y se conservan así durante dos horas antes de cualquier otra manipulación, de forma que se equilibre la temperatura con la de los flujos fisiológicos.

- Los resultados, presentados en la figura 4, muestran que el agua introducida en forma de vapor en el compartimento comienza a condensarse bastante rápidamente después de la aplicación del dispositivo. Según estos resultados, que expresan los datos iniciales y finales del sistema, las cantidades de vapor de agua y de agua líquida calculados al final de las 20 horas son, respectivamente, de $1,08 \text{ mg}/\text{cm}^2$ de agua líquida y de $0,3 \text{ mg}/\text{cm}^2$ en forma de vapor de agua. Según el examen visual en el transcurso de la experiencia, el agua parece acumularse en forma líquida en la superficie de la piel.

Ejemplo 5: Aumento del porcentaje de hidratación de diferentes capas de la epidermis (superficial, superficial y media, epidermis completa) a lo largo del tiempo después de la aplicación del dispositivo con compartimento de condensación.

- El Hydrasan[®] es un dispositivo de medida de la hidratación de la epidermis puesto a punto por la sociedad Dermiscan[®]. El principio de las medidas se basa en la transferencia térmica de paso (TTT): se genera un pulso de calor constante por un estimulador cercano al detector térmico y se propaga a través de la epidermis. Cada cambio de temperatura en la piel es proporcional a la cantidad de agua en la piel (Girard P., Beraud A. y Sirvent A. Study of three complementary techniques for measuring cutaneous hydration in vivo in human subjects: NMR spectroscopy, transient thermal transfer and corneometry – application to xerotic skin and cosmetics – *Skin Research and Technology*, 2000, 6: 205-213).

Las medidas se dan en mW/°C (es la conductancia térmica, que mide la facultad de conducir el calor entre dos puntos en función de la diferencia de temperatura entre estos dos puntos).

El dispositivo permite medir la hidratación en la epidermis distinguiendo 3 capas: la capa superficial, la capa intermedia y la capa profunda de la epidermis.

- 5 Este estudio ha sido realizado en un grupo de 15 voluntarios: mujeres de 18-50 años, caucásicas, de piel normal, dispositivo con compartimento de condensación de 70 mm³ aplicado sobre el antebrazo a 28°C. La cinética de hidratación se ha realizado con medidas de Hydrascan a los tiempos: 0 horas, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas. La determinación de la hidratación de la epidermis en el compartimento de condensación ha sido realizada para cada tiempo en comparación con una determinación en una zona de la piel no sometida a la aplicación del compartimento de condensación. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 5 y muestran un aumento del grado de hidratación en el compartimento de condensación, desde la primera hora de aplicación, hidratación que puede ser mantenida a lo largo del tiempo.

Ejemplo 6: Aumento de la hidratación en la superficie de la piel a lo largo del tiempo después de la aplicación del dispositivo con compartimento de condensación.

- 15 Este estudio ha sido realizado en un grupo de 15 voluntarios: mujeres de 18-50 años, caucásicas, de piel normal, dispositivo con compartimento de condensación de 70 mm³ aplicado sobre el antebrazo a 26°C. La determinación de la pérdida insensible de agua (PIA) ha sido realizada con un dispositivo Tewameter® 210 (Courage and Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemania).

- 20 La determinación de la cantidad de agua acumulada en el compartimento de condensación, y por lo tanto sobre la piel, ha sido calculada mediante medidas de PIA registradas cada segundo durante 90 segundos después de que el dispositivo había sido retirado. Para cada tiempo de medida se han calculado las áreas bajo la curva. Las medidas han sido realizadas a 0 horas, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas después de la aplicación del compartimento de condensación.

- 25 Los resultados obtenidos se presentan en la figura 6 y muestran un aumento de la cantidad de agua acumulada en la superficie de la piel en el transcurso del tratamiento.

Ejemplo 7: Potencialización de la respuesta inmune de anticuerpo anti-ovoalbúmina inducida por vía epicutánea prologando la duración de la aplicación sobre la piel.

- 30 Dispositivos que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de 10 mm³/cm², cargados con OVA (100 µg) o TT (100 µg) en forma seca, se han aplicado durante 24 ó 48 horas en el lomo de ratones BALB/c hembras (n = 6 para la figura 7A, n = 10 para la figura 7B), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones. Las aplicaciones han sido renovadas según dos regímenes diferentes:

- Protocolo 1: 2 y 4 semanas después de las primeras (figura 7A y 7B),
- Protocolo 2: 2, 7, 9, 14, 21 y 28 días después de las primeras (figura 7B).

- 35 Los anticuerpos anti-OVA de tipo IgG totales han sido dosificados por ELISA en los sueros de los animales extraídos 2 semanas después de la última aplicación. Los resultados presentados en las figuras 7A y 7B se expresan en título de anticuerpo específico del antígeno. Se trata para el suero de cada animal de la inversa de la dilución a la que la absorbancia medida a 450 nm es igual al punto de corte determinado a partir del suero de ratones no tratados. Los resultados muestran una respuesta de anticuerpo específica particularmente pronunciada para tiempos de colocación de 48 horas.

- 40 **Ejemplo 8: Inducción de una respuesta inmune de anticuerpo potente específica del inmunógeno por vía epicutánea sin compuesto adyuvante ni tratamiento perforante o abrasivo de la piel en comparación con un sistema de tipo parche.**

- 45 Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de 10 mm³/cm², cargados con un inmunógeno modelo de la toxina del cólera, en forma seca, se han aplicado durante 24 horas en el lomo de ratones BALB/c hembras (n = 10), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones. Las aplicaciones han sido renovadas 2 y 4 semanas después de las primeras. Por otra parte, sistemas tipo parche compuesto por una gasa sobre la que se ha adsorbido el inmunógeno en forma líquida, recubierta con un esparadrapo común han sido aplicados sobre el lomo de ratones BALB/C hembras en las mismas condiciones que el dispositivo descrito precedentemente. Los anticuerpos anti-antígeno de tipo IgG totales han sido dosificados por ELISA en los sueros de los animales extraídos 2 semanas después de la última aplicación. Los resultados presentados en la figura 8 se expresan en título de anticuerpo específico del antígeno. Se trata para el suero de cada animal de la inversa de la dilución a la que la absorbancia medida a 450 nm es igual al punto de corte determinado a partir del suero de ratones no tratados.

Los resultados muestran la inducción de una respuesta inmune específica del inmunógeno mayor cuando se utilizaba el dispositivo de administración cutánea que contiene un compartimento de condensación en comparación con el sistema de tipo parche.

Ejemplo 9: Inducción de una respuesta inmune de anticuerpos anti-TT por vía epicutánea sin compuesto adyuvante para una dosis de antígeno pequeña

Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de $10 \text{ mm}^3/\text{cm}^2$, cargados con la TT (10 ó $100 \mu\text{g}$) en forma seca, se han aplicado durante 24 ó 48 horas en el lomo de ratones BALB/c hembras ($n = 10$), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones. Las aplicaciones han sido renovadas 2 y 4 semanas después de las primeras. Los anticuerpos anti-antígeno de tipo IgG totales han sido dosificados por ELISA en los sueros de los animales extraídos 2 semanas después de la última aplicación. Los resultados, presentados en la figura 9, se expresan en título de anticuerpo específico del antígeno. Se trata para el suero de cada animal de la inversa de la dilución a la que la absorbancia medida a 450 nm es igual al punto de corte determinado a partir del suero de ratones no tratados.

Los resultados muestran una inducción de título de anticuerpos específica de antígeno equivalente para dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación cargados con **$100 \mu\text{g}$ y aplicados durante 24 horas** y para dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación cutánea cargados con **$10 \mu\text{g}$ y aplicados durante 48 horas**.

Ejemplo 10: Inducción de un espesamiento de la epidermis proporcional a la prolongación de la duración de la aplicación del dispositivo que contiene un compartimento de condensación sobre la piel

Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de $10 \text{ mm}^3/\text{cm}^2$, cargados con la OVA ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) en forma seca, se han aplicado durante 0 , 24 ó 48 horas en el lomo de ratones BALB/c hembras ($n = 8$ a 16), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones. Se ha extraído y congelado la zona de piel bajo el compartimento de condensación. Los cortes de piel obtenidos a partir de las muestras han sido coloreados con Hemalum-eosina. Los resultados, presentados en la figura 10, son representativos de las observaciones hechas en el microscopio con un aumento $\times 200$.

Los resultados muestran que la aplicación del dispositivo de administración cutánea que contiene un compartimento de condensación cargado con OVA induce un espesamiento de la epidermis visible después de 24 horas de aplicación y mayor después de 48 horas de aplicación.

Ejemplo 11: Inducción de la penetración del antígeno en la piel y de la absorción por las células dendríticas, proporcionales a la prolongación de la duración de la aplicación del dispositivo que contiene un compartimento de condensación sobre la piel

Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de $10 \text{ mm}^3/\text{cm}^2$, cargados con OVA ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) acoplada con Alexa 488 (A_{488}) en forma seca, se han aplicado durante 6 , 24 ó 48 horas en el lomo de ratones BALB/c hembras ($n = 10$ a 20), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones. Se ha extraído la zona de piel bajo el compartimento de condensación. Después de la separación de la epidermis y la dermis (tripsina $0,5\%$), se han aislado las células epidérmicas por re-suspensión mecánica y las células de la dermis por digestión enzimática (colagenasa/DNasa). La OVA- A_{488} ha sido detectada en las suspensiones celulares y entre las células dendríticas, células identificadas mediante el marcador CD11c, por citometría de flujo (FACScalibur y el programa Cell quest). Los resultados, presentados en la figura 11, se expresan en porcentaje de células fluorescentes (OVA- A_{488}^+) entre las células totales y entre las células dendríticas (CD11c $^+$) de cada suspensión celular (epidermis y dermis).

Los resultados muestran que células epidérmicas y dérmicas son OVA- A_{488}^+ y que su proporción aumenta con la prolongación de la duración de la aplicación del dispositivo de administración cutánea que contiene un compartimento de condensación cargado con OVA- A_{488} . Una parte de estas células OVA- A_{488}^+ son células dendríticas (CD11c $^+$) y, de la misma forma, el porcentaje de células dendríticas OVA- A_{488}^+ aumenta con la prolongación de la duración de la aplicación del dispositivo de administración cutánea que contiene un compartimento de condensación.

- Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de $10 \text{ mm}^3/\text{cm}^2$, cargados con OVA ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) acoplada con Alexa 488 (A_{488}) en forma seca, se han aplicado durante 24 horas en el lomo de un cerdo ($n = 1$), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones.

Se ha extraído la zona de piel bajo el compartimento de condensación. Después de la separación de la epidermis y la dermis (tripsina $0,5\%$), se han aislado las células epidérmicas por re-suspensión mecánica y las células de la dermis por digestión enzimática (colagenasa/DNasa). La OVA- A_{488} ha sido detectada en las suspensiones celulares y entre las células dendríticas, células identificadas mediante el marcador SLA-II, por citometría de flujo (FACScalibur y el programa Cell quest). Los resultados, presentados en la figura 11, se expresan en porcentaje de

células fluorescentes (OVA-A₄₈₈⁺) entre las células totales y entre las células dendríticas (SLA-II⁺) de cada suspensión celular (epidermis y dermis).

Los resultados muestran que células epidérmicas y dérmicas son OVA-A₄₈₈⁺ después de una aplicación de 24 horas del dispositivo de administración cutánea que contiene un compartimento de condensación cargado con OVA-A₄₈₈. Una parte de estas células OVA-A₄₈₈⁺ son células dendríticas (SLA-II⁺).

Los resultados de la figura 11 muestran que el dispositivo de administración cutánea que contiene un compartimento de condensación favorece la penetración del antígeno en la piel y su absorción por las células dendríticas.

Ejemplo 12: Inducción de la modificación de la red de células de Langerhans epidérmicas, proporcional a la prolongación de la duración de aplicación del dispositivo que contiene un compartimento de condensación sobre la piel

Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de 10 mm³/cm², cargados con la OVA (100 µg) en forma seca, se han aplicado durante 0, 24 ó 48 horas en el lomo de ratones BALB/c hembras (n = 5), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones. Se ha extraído y congelado la zona de piel bajo el compartimento de condensación. Se han identificado las células de Langherans en los cortes de piel obtenidos a partir de las muestras mediante el marcador CD207. Los resultados, presentados en la figura 12, son representativos de las observaciones hechas en el microscopio con un aumento x200.

Los resultados muestran que la aplicación del dispositivo de administración cutánea que contiene un compartimento de condensación cargado con OVA induce una modificación de la red de células de Langherans de la epidermis, visible después de 24 horas de aplicación y mayor después de 48 horas de aplicación. Este fenómeno es característico de una activación de estas células.

Ejemplo 13: Inducción de la producción de anticuerpos específicos de un antígeno tumoral capaces de dirigir *in vitro* las células que expresan este antígeno después de aplicaciones de 24 horas sobre la piel de un dispositivo que contiene un compartimento de condensación cargado con el antígeno tumoral.

Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de 10 mm³/cm², cargados con un antígeno antitumoral en forma seca, se han aplicado durante 24 horas en el lomo de ratones BALB/c hembras (n = 6), rasurado y depilado la víspera de las aplicaciones. Las aplicaciones han sido renovadas 2 y 4 semanas después de las primeras. Los anticuerpos anti-antígeno de tipo IgG totales han sido dosificados por ELISA en los sueros de los animales extraídos 2 semanas después de la última aplicación. Los sueros de los animales han sido incubados con células que expresan el antígeno tumoral. La fijación de los anticuerpos anti-antígeno tumoral sobre las células ha sido detectada después del marcado con un anticuerpo anti-Ig de ratón fluorescente por citometría de flujo (FACScallibur y el programa Cell quest). Los resultados en la figura 13 se expresan en forma de histograma que presenta la intensidad de la fluorescencia en función del número de células.

Los resultados muestran que los anticuerpos anti-antígeno tumoral contenido en el suero de ratones inmunizados por vía epicutánea usando un dispositivo de administración cutánea que contiene un compartimento de condensación cargado con el antígeno tumoral, reconocen *in vitro* las células que expresan el antígeno tumoral.

Ejemplo 14: Inducción de una protección parcial contra una infección por el virus respiratorio sincitial (VRS) de crías de ratón después de una aplicación de 48 horas sobre la piel de un dispositivo que contiene un compartimento de condensación cargado con un antígeno del VRS.

Dispositivos de administración cutánea que contienen un compartimento de condensación, preparados según el ejemplo 1 pero con un volumen de 10 mm³/cm², cargados con un antígeno del virus respiratorio sincitial en forma seca, se han aplicado durante 48 horas en el lomo de crías de ratón BALB/c (7 días). El antígeno ha sido co-administrado con un adyuvante por vía intranasal como control. La prueba viral ha sido realizada 23 días después de la vacunación por vía nasal. La dosificación de los ARN virales ha sido realizada a partir de los pulmones extraídos 5 días después de la infección. Los resultados presentados en la figura 14 se expresan en cantidades relativas de ARN virales en los pulmones en relación a un gen de referencia y normalizado con respecto a un testigo positivo (individuo no vacunado).

Los resultados muestran que la carga viral de las crías de ratón después de una aplicación de 48 horas sobre la piel de un dispositivo que contiene un compartimento de condensación cargado con un antígeno del VRS disminuye a la mitad con respecto a las crías de ratón no tratadas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Utilización de una formulación de vacuna para la preparación de una composición para la vacunación epicutánea de un mamífero, preferentemente un humano, caracterizada por que la formulación de vacuna está en forma seca y desprovista de adyuvante, y por que se administra por aplicación sobre la piel intacta del mamífero por medio de un dispositivo cutáneo que forma en contacto con la piel un compartimento de condensación que posee un volumen comprendido entre 1 y 300 mm³/cm² de superficie del dispositivo, conteniendo dicho dispositivo una cantidad de formulación de vacuna comprendida entre 0,1 µg y 500 µg por cm² de superficie, manteniéndose el dispositivo sobre la piel durante un periodo de 6 a 72 horas, e induciendo dicha aplicación de la formulación en forma seca y desprovista de adyuvante sobre la piel intacta una respuesta inmune específica de antígeno caracterizada por la producción de anticuerpos del tipo IgG.
- 2.- Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que las paredes del compartimento de condensación comprenden un material que presenta un grado de permeabilidad inferior a 10 g/m²/24 horas.
- 3.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el compartimento de condensación posee un volumen comprendido entre 2 y 100 mm³ por cm² de superficie.
- 4.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el compartimento de condensación permite inducir un aumento del grado de hidratación en el compartimento de condensación y a la superficie externa de la epidermis de 50% al menos después de una hora de aplicación.
- 5.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el dispositivo se mantiene sobre la piel por medios adhesivos.
- 6.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la formulación de vacuna está en forma de polvo.
- 7.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la formulación de vacuna se mantiene sobre una superficie del dispositivo por fuerzas de naturaleza química o fisicoquímica, en ausencia de material adhesivo sobre esta superficie.
- 8.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la formulación de vacuna se mantiene sobre una superficie del dispositivo por fuerzas electrostáticas o fuerzas de Van der Waals.
- 9.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el dispositivo contiene una cantidad de formulación de vacuna comprendida entre 20 µg y 300 µg por cm² de superficie, más preferentemente entre 20 µg y 100 µg por cm² de superficie.
- 10.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la formulación de vacuna comprende al menos un antígeno de naturaleza peptídica o polipeptídica o conjugados polipeptídicos con compuestos de naturaleza química diferente.
- 11.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que comprende la aplicación sucesiva al sujeto de dos dispositivos al menos, preferentemente tres al menos, estando cada aplicación espaciada de 7 a 30 días aproximadamente, preferentemente de 10 a 20 días, típicamente 15 días aproximadamente.
- 12.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que en cada aplicación el dispositivo se mantiene sobre la piel durante un periodo de 6 a 48 horas aproximadamente, más preferentemente de aproximadamente 48 horas.
- 13.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que comprende tres aplicaciones sucesivas de al menos un dispositivo, durante un periodo de aproximadamente 48 horas, estando espaciada cada aplicación aproximadamente 15 días.

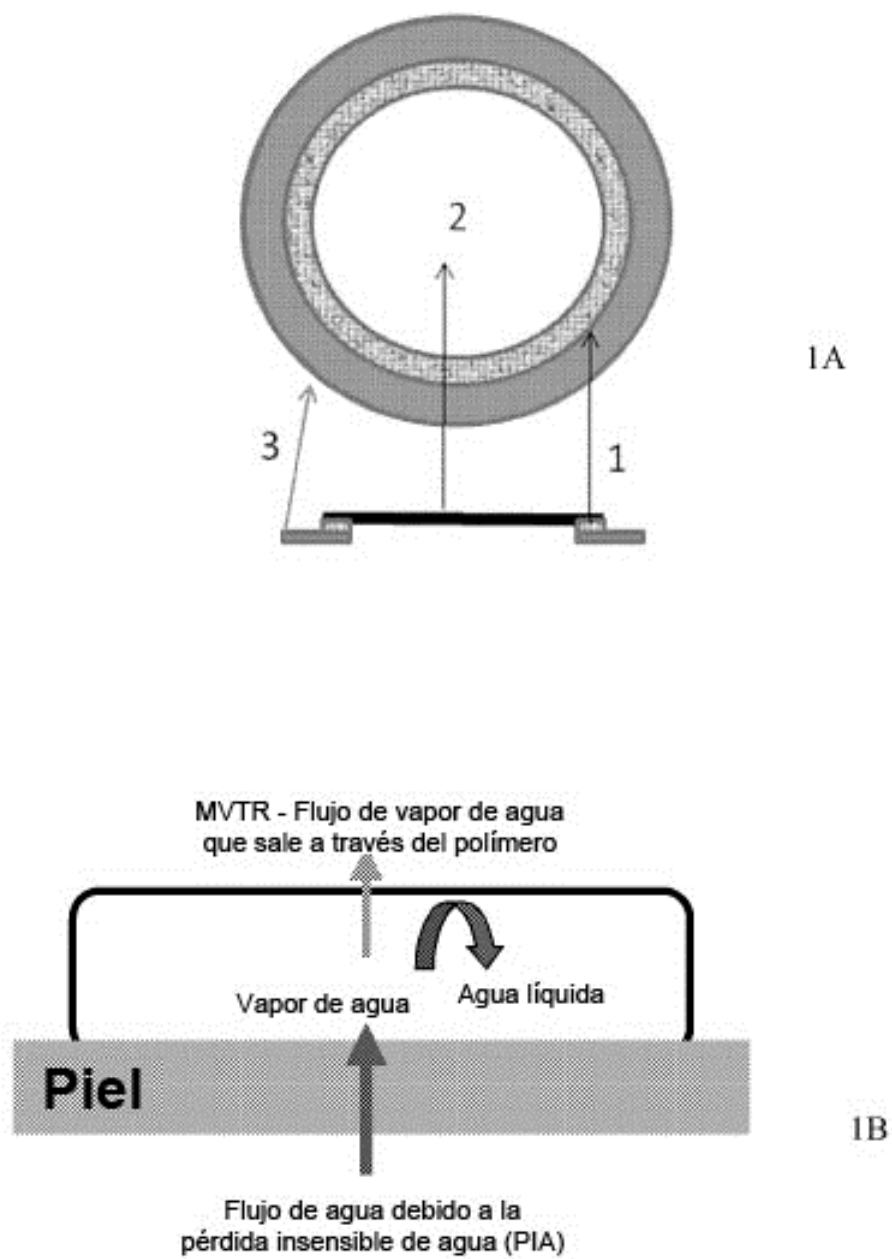


FIGURA 1

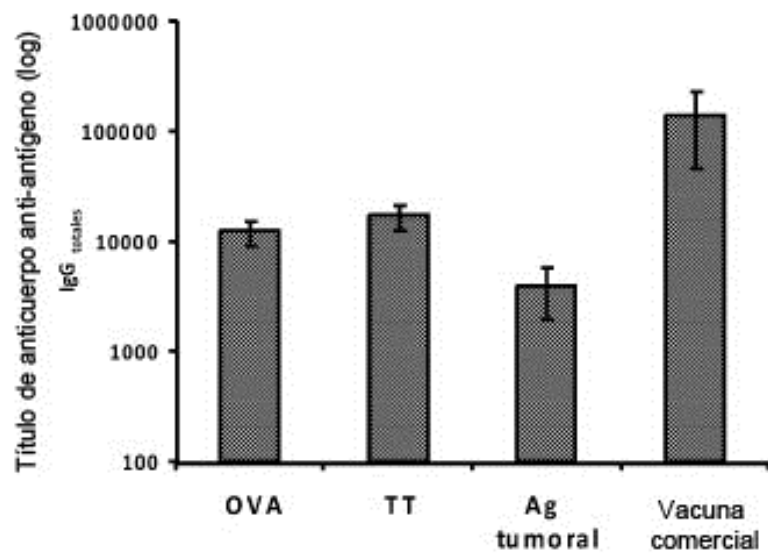


FIGURA 2

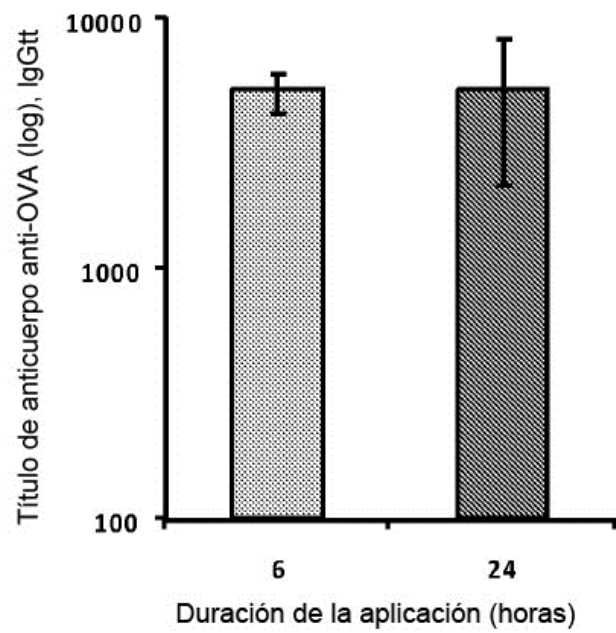


FIGURA 3

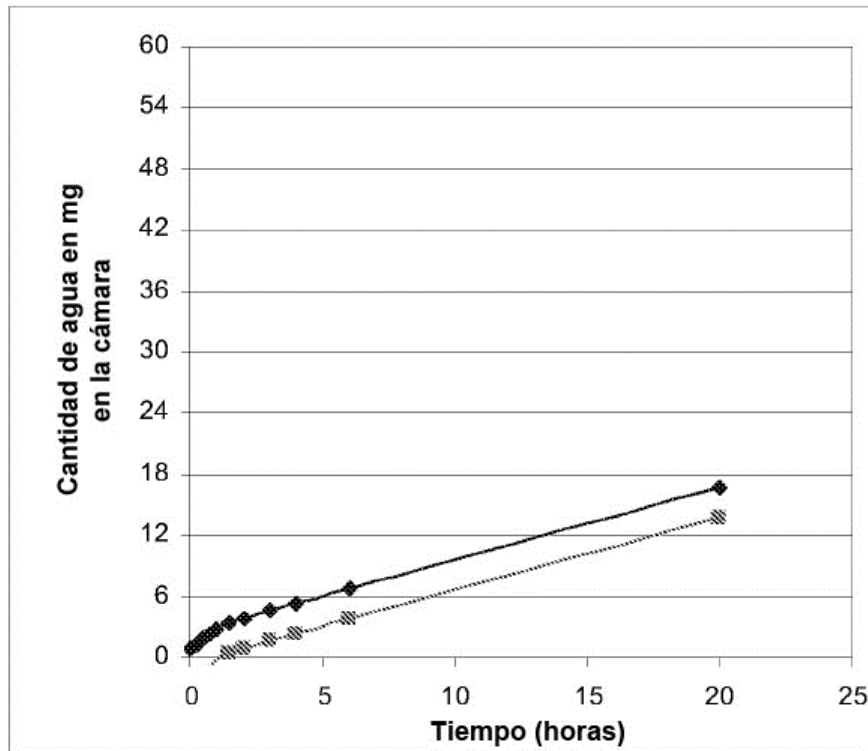


FIGURA 4

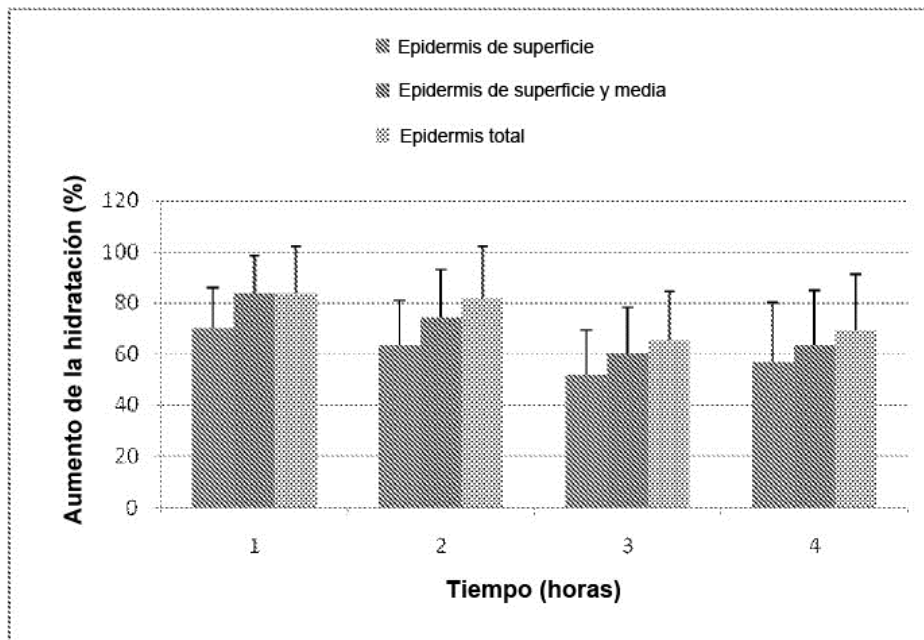


FIGURA 5

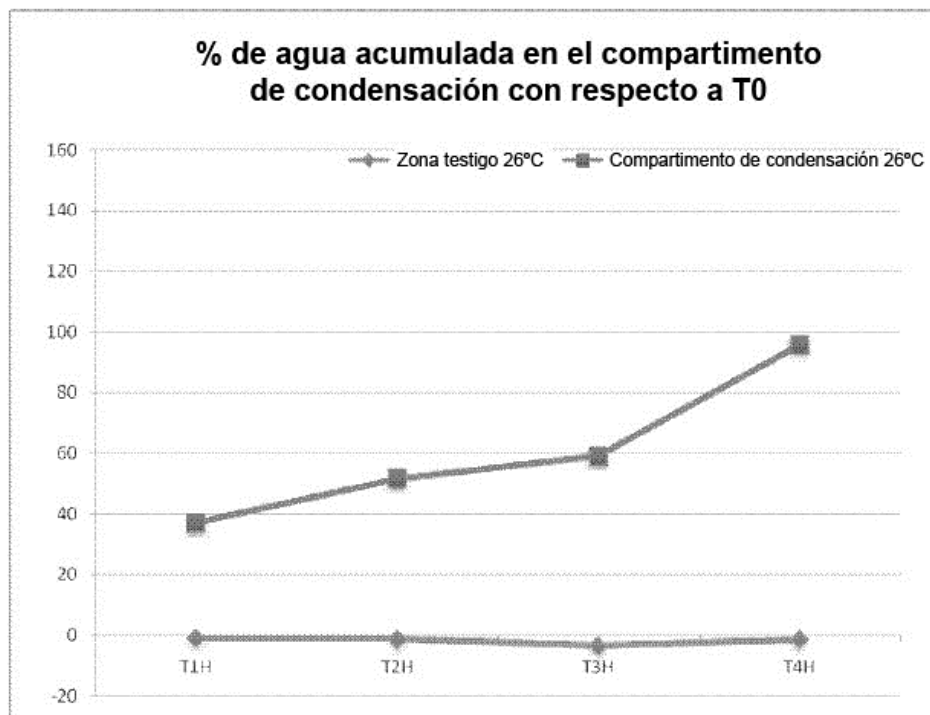


FIGURA 6

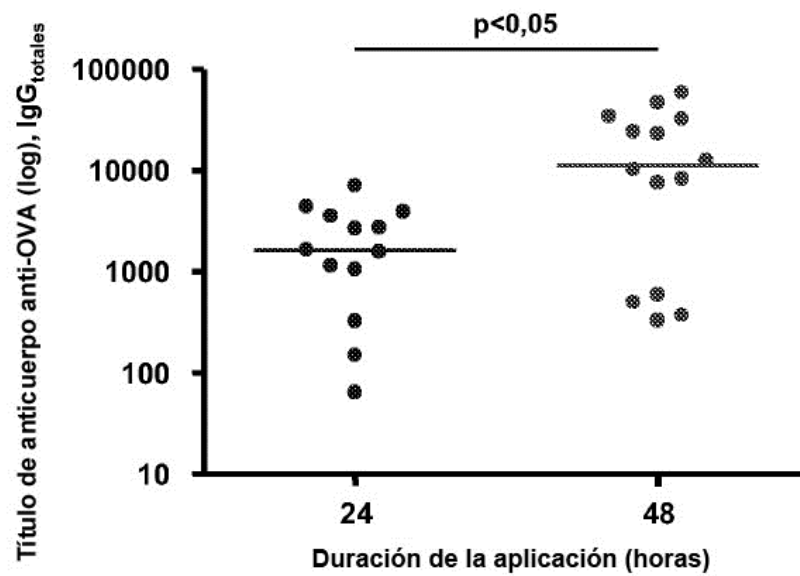


FIGURA 7A

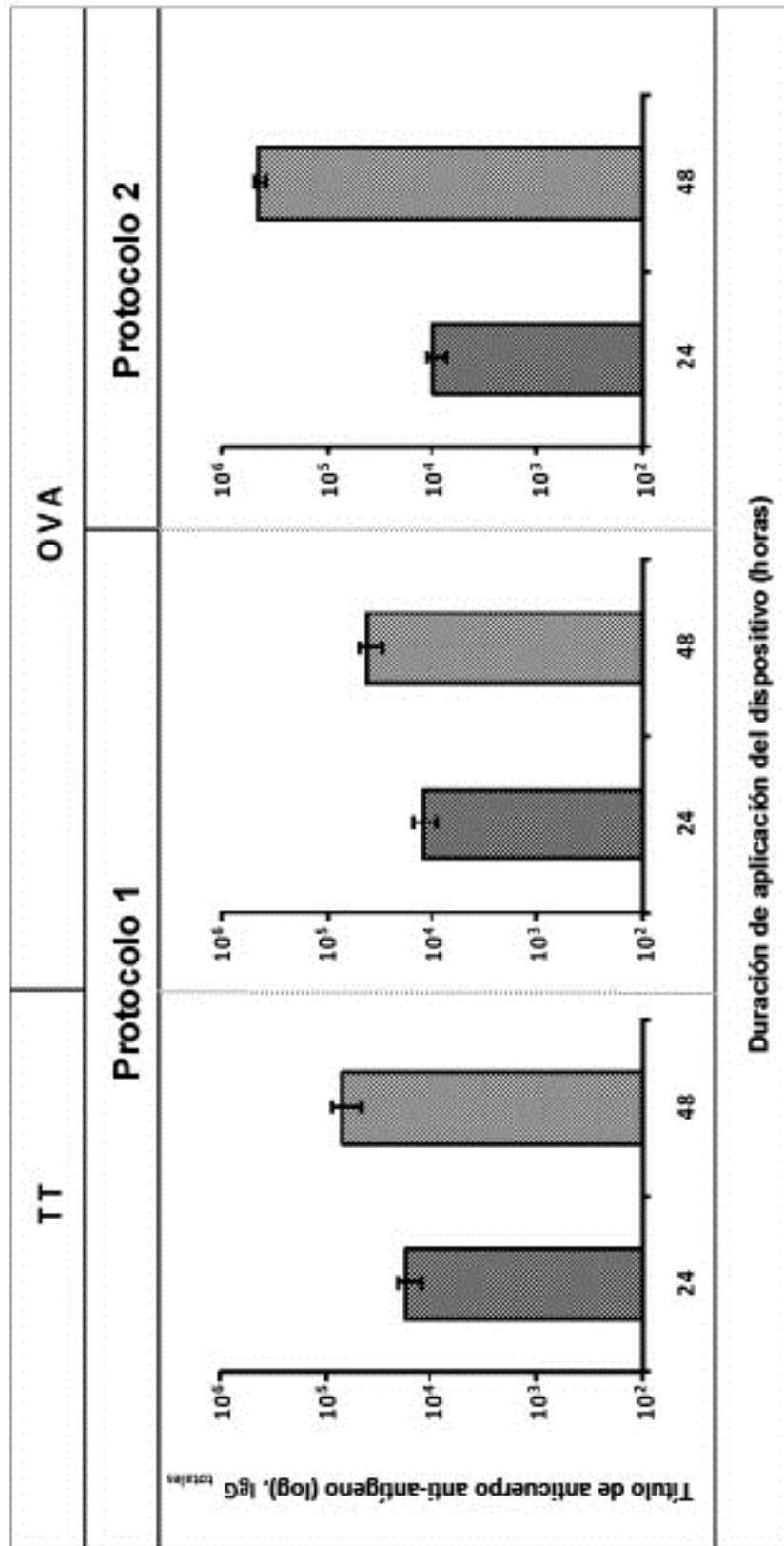


FIGURA 7B

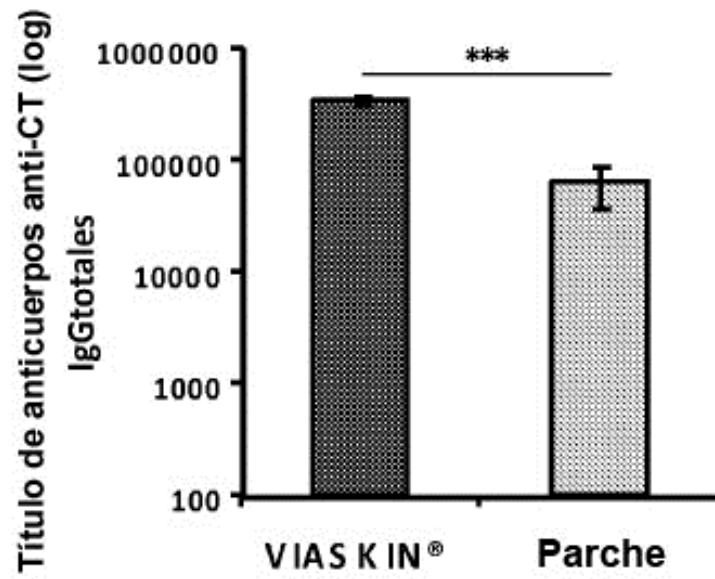


FIGURA 8

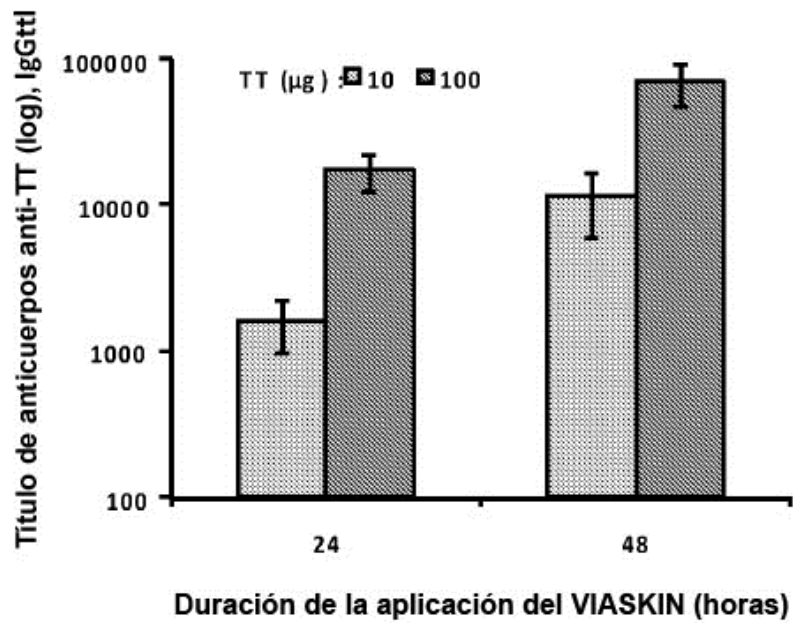


FIGURA 9

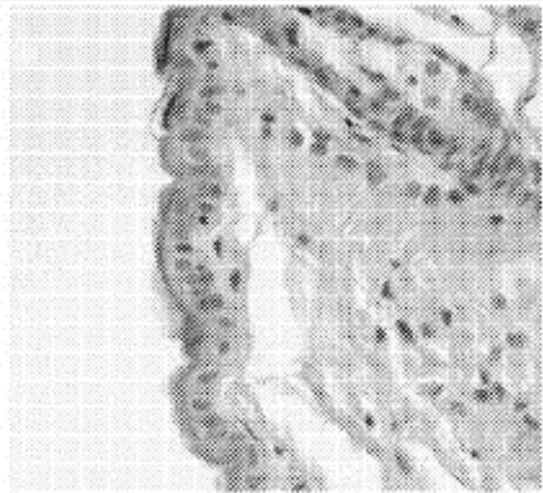
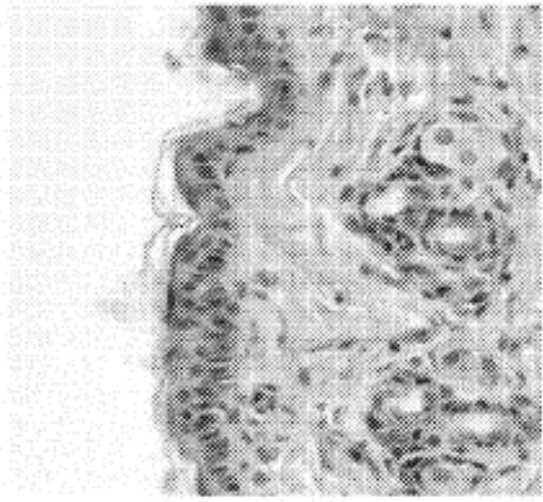
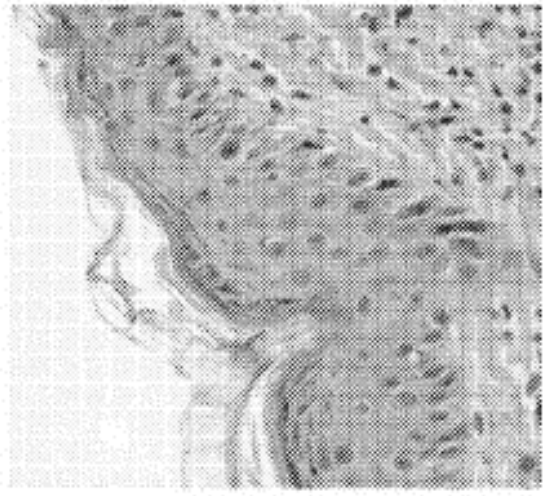
Espesamiento de la epidermis después de la aplicación de VIASKIN cargado con OVA			
			
0	24	48	
Duración de la aplicación de VIASKIN (horas)			

FIGURA 10

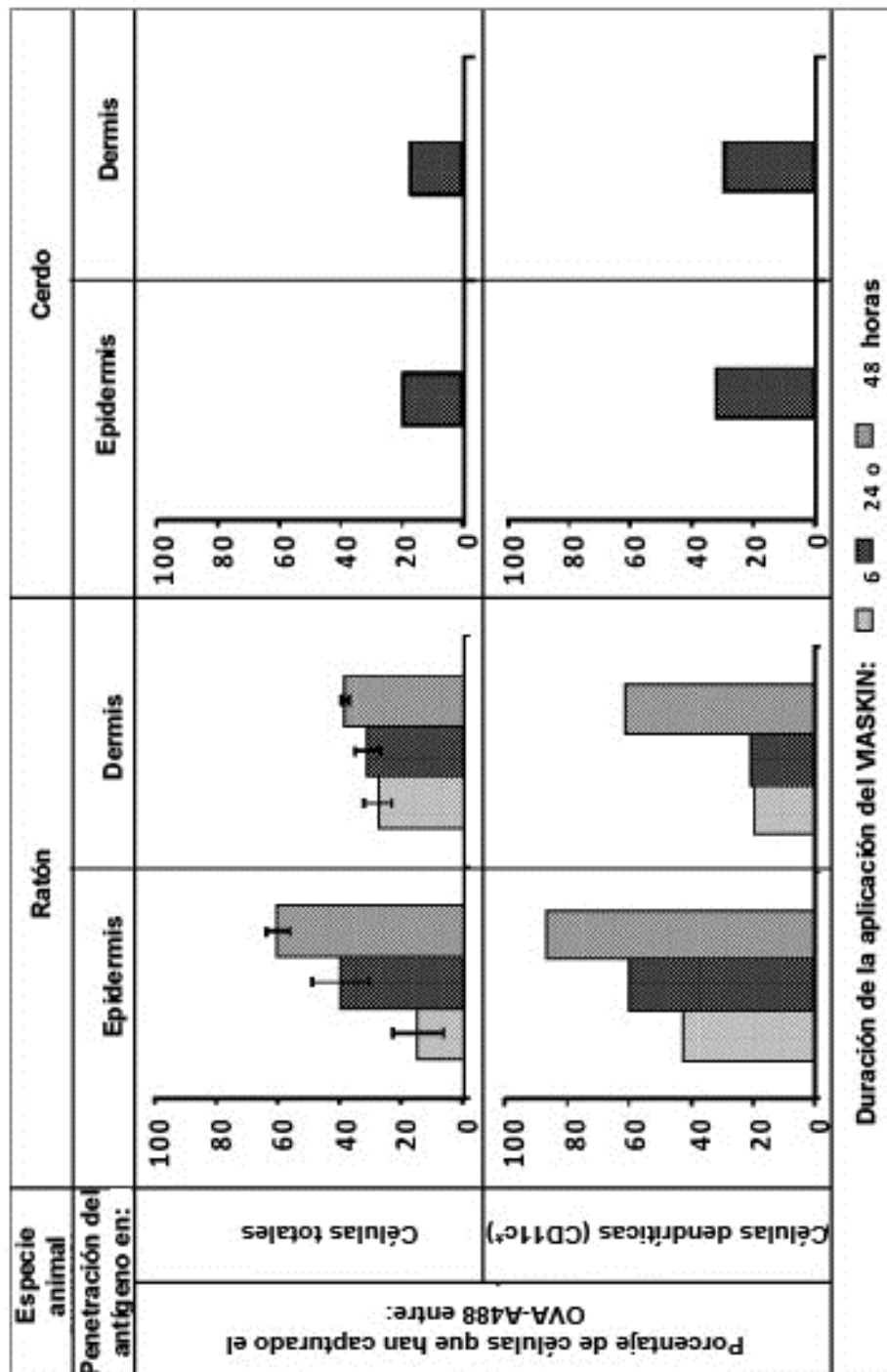


FIGURA 11

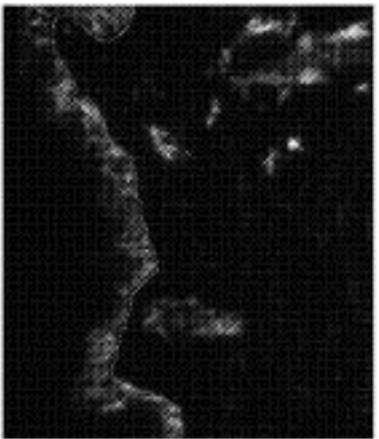
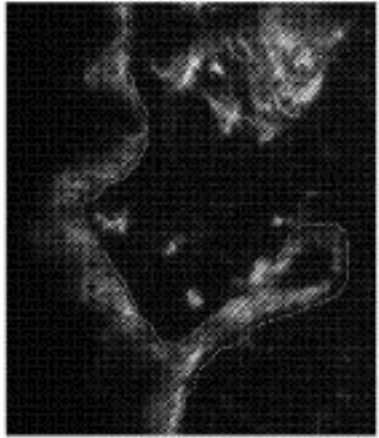
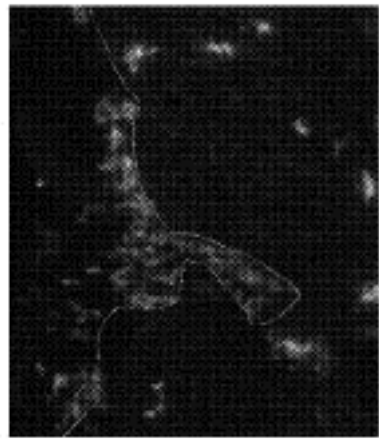
Modificación de la red de células de Langherans después de la aplicación de VIASKIN cargado con OVA			
			
0	24	48	
Duración de la aplicación de VIASKIN (horas)			

FIGURA 12

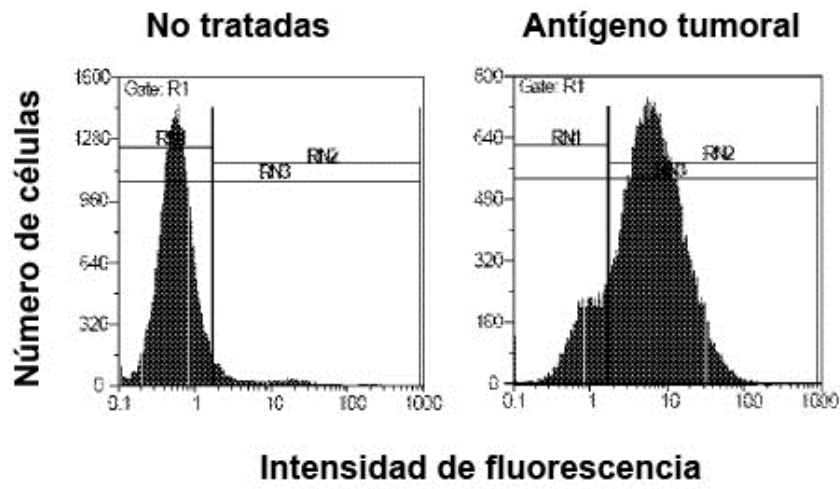


FIGURA 13

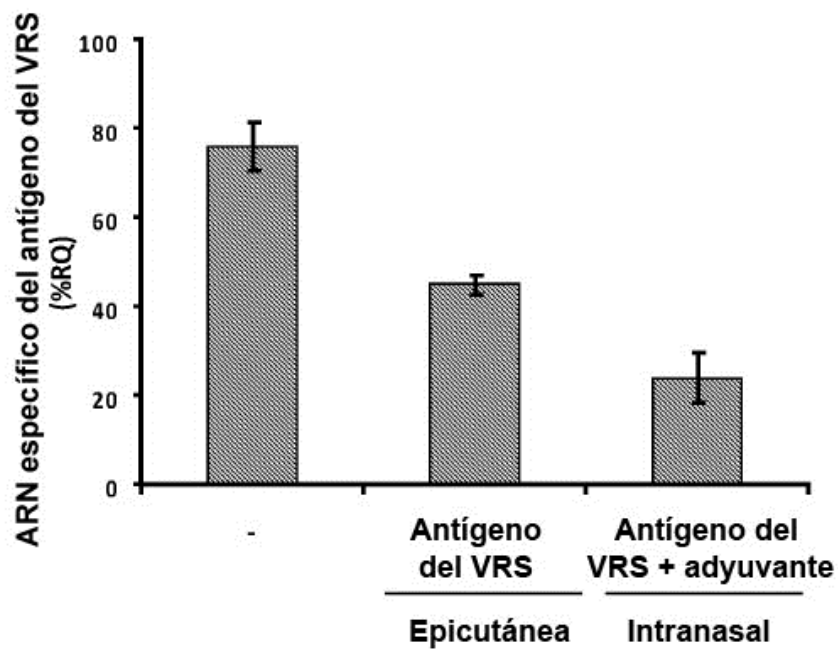


FIGURA 14