

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 839**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2011** **PCT/EP2011/055991**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011** **WO11128430**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011** **E 11714559 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016** **EP 2547358**

54 Título: **Método de vacunación**

30 Prioridad:

16.04.2010 EP 10305399

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

24.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SIEGRIST, CLAIRE-ANNE y
MONDOULET, LUCIE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 609 839 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

Método de vacunación

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a métodos mejorados para la vacunación de un sujeto. En particular, la presente invención describe el uso de la aplicación de un antígeno de la piel para amplificar y mejorar la inmunidad preexistente contra un patógeno seleccionado en un sujeto. La presente invención describe el uso de la aplicación en la piel, en combinación con la vacuna convencional o iniciación para mejorar la inmunización o vacunación de un sujeto contra un patógeno seleccionado.

Antecedentes de la invención

- 10 La vacunación de un sujeto es un método para generar una respuesta protectora inmunitaria contra un patógeno seleccionado. La vacunación puede ser preventiva, es decir, realizada antes de la exposición del sujeto al patógeno, y/o curativa, es decir, llevada a cabo después de la exposición, con el fin de aumentar, ampliar o estimular la defensa inmunológica del sujeto contra el agente patógeno.

- 15 La vacunación convencional comprende la administración parenteral, nasal u oral de un antígeno al sujeto. La mayoría de los programas de vacunación comprende la (repetida) administración parenteral (por ejemplo, inyección) a un sujeto de un antígeno específico seleccionado del patógeno para así inducir o amplificar el sistema inmunológico del sujeto contra el patógeno. La vacunación convencional también puede ser oral o nasal.

- 20 Generalmente la vacunación comprende un protocolo de administración repetida, incluyendo una administración de iniciación seguida de una o varias administraciones de refuerzo. En la mayoría de los casos, tal vacunación de estímulo primario, que requiere más de una vez la inmunización, se realiza utilizando las mismas vacunas varias veces como estímulos homólogos. Además, en los programas de vacunación convencionales, el antígeno se usa generalmente en combinación con uno o más adyuvantes, con el fin de generar la respuesta inmunitaria apropiada.

- 25 Wu et al. (2005) describe un método de estímulo primario heterólogo convencional en el que la iniciación se realiza mediante la inyección de un primer antígeno (un plásmido de ADN que codifica un antígeno) y la estimulación que se realiza mediante la inyección de una segunda preparación (un vector de adenovirus incompetente para la replicación que codifica el mismo antígeno). Este enfoque ha sido probado en el desarrollo de vacunas contra una serie de patógenos virales, incluyendo el VIH, virus de la hepatitis C, virus del Ébola y el virus de la encefalitis equina venezolana. La iniciación con ADN seguida por la estimulación con adenovirus también se ha evaluado como un enfoque para la inmunización contra una enfermedad bacteriana (McConnell et al., 2007).

- 30 La vacunación convencional se ha investigado usando diferentes tipos de antígenos, como por ejemplo, proteínas, péptidos, células, patógenos inactivados, toxoides, partículas similares a virus, etc.

La aplicación tópica de formulaciones de vacunas en la piel también se ha propuesto.

- 35 En particular, Partidos et al. 2003, han demostrado que una respuesta inmunitaria puede ser causada por vía epicutánea, sujeta a condiciones específicas de administración, el uso de un adyuvante particular y el pretratamiento de la piel.

El documento US 7.378.097 se refiere también a la vacunación mediante la aplicación, sobre la piel previamente tratada, de composiciones de antígeno adyuvante.

- 40 Mishra et al., 2006, propone un sistema de inmunización transcutánea usando nuevas construcciones vesiculares, vesosomas fusogénicos, que entregan antígenos a través de la administración tópica. Sin embargo, este sistema vesicular es un sistema líquido, no oclusivo, y necesita la aplicación de un antígeno junto con un adyuvante sobre la piel hidratada.

Hammond et al., 2001, propone el método de vacunación transcutánea de ratones con toxina del cólera y adyuvante, por la cual se aplican soluciones líquidas de antígenos con adyuvante por vía tópica a la piel hidratada.

- 45 Todos los métodos anteriores requieren el uso de un adyuvante para provocar una respuesta inmunitaria. Además, utilizan preparaciones líquidas, y la naturaleza de las respuestas inmunológicas provocadas no es controlada ni analizada.

- 50 Los documentos W02007/122226 y W02009/080933 describen la inmunización epicutánea usando preparaciones de antígenos que carecen de adyuvante aplicadas sobre piel intacta. Esta aplicación muestra que una respuesta protectora puede ser obtenida sin adyuvante añadido y sin el pretratamiento de la piel, mediante la aplicación de un antígeno en la piel.

A pesar de las estrategias y respuestas positivas para la vacunación o la protección de sujetos mamíferos, todavía hay una necesidad en la técnica de métodos de inmunización mejorados, que son más convenientes para el

paciente e inducen una respuesta inmunitaria adecuada y eficaz para prevenir o tratar dolencias tales como enfermedades infecciosas.

Compendio de la invención

- La presente solicitud proporciona un nuevo método de desarrollo de la inmunidad contra patógenos en sujetos mamíferos. Más particularmente, la invención proporciona métodos de amplificación y/u orientación de la inmunidad preexistente en los sujetos que utilizan la aplicación de antígenos epicutáneos. Tal como se divulgará en la presente solicitud, este método conduce a una fuerte respuesta inmunitaria orientada a TH1 y es mucho más conveniente que los protocolos de vacunación actuales. En particular, la invención muestra que un estímulo cutáneo provoca, tanto una amplificación de una respuesta inmunitaria pre-existente como una polarización por TH1 de la respuesta inmunitaria, lo cual es particularmente adecuado para la vacunación eficaz. La invención también describe un método para estimulación y/u orientación a TH1 de la respuesta inmunitaria preexistente contra un patógeno en un sujeto mamífero, en el que el método comprende aplicar en la piel de un sujeto, que tiene una respuesta inmunitaria preexistente contra un patógeno, un antígeno específico para el patógeno; conduciendo dicha aplicación en la piel a la estimulación y orientación a TH1 de la respuesta.
- En particular, la invención se refiere a la preparación de un antígeno tal como es definido en las reivindicaciones. La invención también se refiere a la preparación de un antígeno específico para un patógeno, para su uso en la amplificación y/u orientación a Th1 de una respuesta inmunitaria preexistente contra dicho patógeno en un sujeto mamífero mediante la aplicación de dicha preparación en la piel del sujeto. Preferiblemente, la preparación de antígeno es seca y/o sin adyuvante.
- Preferiblemente, la preparación de antígeno se aplica sobre piel intacta del sujeto. Además, en una realización preferida, la preparación de antígeno se aplica sobre la piel del sujeto mediante un dispositivo de parche oclusivo.
- La invención también se refiere al uso de la preparación de un antígeno específico para un patógeno para la fabricación de un medicamento para amplificación y preferiblemente orientación a Th1 de la respuesta inmunitaria preexistente contra dicho patógeno en un sujeto mamífero, mediante la aplicación de dicha preparación a la piel del sujeto. Preferiblemente, el antígeno es seco y/o sin adyuvante.
- Tal como será descrito en la presente solicitud, la inmunidad preexistente puede ser el resultado de la previa vacunación convencional del sujeto contra dicho patógeno, de la previa iniciación inmunológica convencional del sujeto contra dicho patógeno y/o de la previa exposición natural del sujeto a dicho patógeno.
- La presente invención también describe un método de vacunación de un mamífero frente a un patógeno seleccionado, en el que el método comprende (i) la administración convencional al mamífero de un antígeno específico para el patógeno, para causar o estimular una respuesta inmunitaria a dicho patógeno, y (ii) la(s) subsiguiente(s) aplicación(es), en la piel del mamífero, de un antígeno específico para el patógeno. Tal como se documentará en la presente memoria, dicha aplicación en la piel permite la amplificación y la orientación a Th1 de la respuesta inmunitaria. La etapa (ii) puede ser llevada a cabo poco después de la etapa (i), o más tarde, siempre que aún exista una inmunidad contra el patógeno en el sujeto. La etapa (ii) consiste típicamente en 1, 2 o 3 tratamientos de estímulo, que pueden realizarse en diferentes intervalos de tiempo para cada uno, dependiendo, por ejemplo, del agente patógeno, típicamente entre 1 y 18 meses.
- Un objeto adicional de la presente invención se refiere, por tanto, a la preparación de un antígeno para su uso en la vacunación de un mamífero contra un patógeno seleccionado, siendo el antígeno administrado convencionalmente por primera vez al mamífero para causar o estimular una respuesta inmunitaria a dicho patógeno, y subsecuentemente aplicado sobre la piel del mamífero.
- Esta invención también describe un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero inmunizado contra un patógeno, en el que el método comprende la aplicación de un antígeno específico para el patógeno sobre la piel de dicho sujeto, preferiblemente en una preparación seca sin adyuvante. Más preferiblemente, la preparación de antígeno es sin adyuvante y se aplica sobre una zona de piel intacta del sujeto.
- Esta invención también describe un método de amplificación y orientación a Th1 de una respuesta inmunitaria contra un patógeno en un sujeto mamífero pre-inmunizado, en el que el método comprende la aplicación de un antígeno específico para el patógeno sobre piel intacta de dicho sujeto pre-inmunizado, preferiblemente de una preparación seca y/o sin adyuvante.
- La invención se refiere también a un antígeno específico para un patógeno (preferiblemente en una preparación seca y/o sin adyuvante) para su uso en la amplificación y orientación a Th1 de una respuesta inmunitaria contra dicho patógeno, en un sujeto mamífero pre-inmunizado por aplicación(es) del antígeno a la piel del sujeto.
- La invención también describe un método para inducir o estimular una respuesta inmunitaria específica de patógeno, orientada a Th1 en un sujeto mamífero, en el que el método comprende la administración convencional al mamífero de un antígeno específico para el patógeno para causar o estimular una respuesta inmunitaria contra dicho patógeno; y posteriormente la(s) aplicación(es), en piel intacta del mamífero, de un antígeno específico para el

patógeno, permitiendo la amplificación de una respuesta inmunitaria orientada a Th1.

La invención también describe un método para amplificar una respuesta inmunitaria preexistente contra un patógeno en un sujeto mamífero, en el que el método comprende la aplicación de una preparación seca y sin adyuvante, de un antígeno específico para dicho patógeno, en piel intacta del sujeto.

- 5 La invención también describe un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero pre-inmunizado contra un patógeno, en el que el método comprende la aplicación de una preparación de antígeno específico para dicho patógeno sobre la piel de dicho sujeto bajo condiciones que permiten la amplificación y la orientación a Th1 de la respuesta inmunitaria.

- 10 Esta invención también describe una composición que comprende la preparación inyectable de un antígeno específico para un patógeno seleccionado; y la preparación seca sin adyuvante de un antígeno específico para dicho patógeno seleccionado, adecuada para su administración a la piel, para aplicación secuencial separada a un sujeto mamífero.

- 15 La invención también describe un conjunto (kit) que comprende una preparación inyectable de un antígeno específico para un patógeno seleccionado; y una preparación seca, sin adyuvante, de un antígeno específico para dicho patógeno seleccionado, adecuada para su administración a la piel.

- 20 La invención puede usarse en cualquier mamífero, particularmente cualquier sujeto humano, para inducir o amplificar una respuesta inmunitaria protectora y/o curativa contra cualquier patógeno. La invención también se puede usar en el campo veterinario para tratar animales tales como ganado vacuno o animales domésticos, incluyendo vacas, cerdos, caballos, perros, gatos, etc. Es particularmente adecuada para vacunar contra patógenos infecciosos.

Leyendas de las figuras

Fig. 1: Influencia del estímulo de la piel en las respuestas de IgG1 anti-HBsAg

Fig. 2: Influencia del estímulo de la piel en las respuestas de IgG2a anti-HBsAg

Fig. 3: Células productoras de citoquina en ratones estimulados dos veces por aplicación en la piel o inyección

- 25 Fig. 4: Secreción de citoquinas en ratones estimulados dos veces por aplicación en la piel o inyección

Fig. 5: Respuestas de IL-5 en ratones estimulados dos veces por aplicación en la piel o inyección (ELISA)

Fig. 6: Respuestas de IFN- γ en ratones estimulados dos veces por aplicación en la piel o inyección (ELISA)

Fig. 7: Comparación de la respuesta inmunitaria inducida en piel intacta y con remoción de cinta: nivel de IgE (7A) e IgG2a (7B) específico.

- 30 Fig. 8: Comparación de la respuesta inmunitaria inducida en piel intacta y con remoción de cinta: recuento de eosinófilos en el esófago

Fig. 9: Comparación de la respuesta inmunitaria inducida en piel intacta y con remoción de cinta: Expresión mRNA de citoquinas en el esófago: eotaxina (Fig. 9A), IL-5 (Fig. 9B) e IL-13 (Fig. 9C)

- 35 Fig. 10: Comparación de la respuesta inmunitaria inducida en piel intacta y con remoción de cinta: Expresión mRNA en el esófago: GATA-3 (Fig. 10A), Foxp3 (Fig. 10B)

Fig. 11: Comparación de la respuesta inmunitaria inducida en piel intacta y con remoción de cinta: datos histológicos - relación vellosidad/críptica en el yeyuno

Descripción detallada de la invención

- 40 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para mejorar la vacunación. En particular, la invención se refiere a la estimulación de una inmunidad preexistente en un sujeto utilizando el suministro de antígeno epicutáneo. La invención describe métodos de vacunación de "estímulo primario" mejorados en los cuales el sistema inmunológico es inducido por la administración convencional de una composición de antígeno de iniciación, y estimulado por la aplicación epicutánea de una composición de antígeno de estimulación. La presente invención también se refiere a métodos para producir una respuesta inmunitaria protectora orientada a TH1 contra un patógeno en un sujeto pre-inmunizado usando administración(es) de antígeno epicutáneo. Este método es seguro para el paciente, práctico, y produce una fuerte respuesta inmunitaria orientada a Th1 en sujetos mamíferos.

- 50 La presente invención muestra que una reacción inmunológica específica provocada por iniciación convencional, previa vacunación y/o exposición natural a un patógeno, la cual está orientada a TH2, puede ser eficazmente amplificada y polarizada por TH1 tras la estimulación epicutánea del sujeto. Los resultados presentados muestran que una estimulación epicutánea sin adyuvante y sin pretratamiento de piel conduce a una amplificación eficaz y a la

orientación a TH1 de una respuesta inmunitaria preexistente. Los resultados muestran además que tal respuesta es particularmente pronunciada cuando el estímulo se realiza utilizando una preparación de antígeno seco y un dispositivo de piel oclusivo.

- 5 La invención puede usarse para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria y para producir inmunidad contra cualquier patógeno. La invención también puede utilizarse para prevenir o tratar enfermedades provocadas por un patógeno.

La presente descripción de la memoria se entenderá mejor haciendo referencia a las siguientes definiciones:

Definiciones

- 10 Como se usa en la presente memoria, la administración o vacunación "convencional" designa la administración o vacunación parenteral, oral o nasal. La administración parenteral puede realizarse mediante inyección (por ejemplo, intramuscular, intradérmica, intravenosa o subcutánea), punción, y/o administración transdérmica. Una vía de administración parenteral preferida es mediante inyección.

- 15 La aplicación epicutánea o cutánea designa la aplicación del antígeno sobre la piel del sujeto bajo condiciones que permitan un contacto con la superficie de la piel. La aplicación en la piel de acuerdo con la presente invención se realiza preferiblemente en piel intacta (o no pretratada). La aplicación en la piel debe mantenerse durante un período de tiempo suficiente para permitir la penetración de un antígeno en la capa o capas superficiales de la piel y/o el contacto del antígeno con células inmunes.

- 20 Dentro del contexto de la presente invención, el término "piel intacta" indica que debe mantenerse sustancialmente la integridad de la capa de estrato córneo. Trabajos anteriores han sugerido que, para una inmunoterapia epicutánea eficiente, una penetración mejorada del antígeno y la activación de la respuesta inmunitaria, es necesario eliminar el estrato córneo de la piel (por ejemplo, a través de abrasivos o remoción de cinta profunda) o pasar a través del estrato córneo (Por ejemplo, utilizando microagujas) (Frerichs et al., Vaccine 2008, p2782; Strid et al., Eur. J. Immunol 2004 p2100). Estos trabajos anteriores indican que, alterando la integridad del estrato córneo, los queratinocitos y las células de Langerhans se activan o estimulan, dando lugar a una mejor respuesta del organismo. En contraste con estas observaciones previas, la invención muestra que es preferible aplicar antígenos en la piel intacta (es decir, no tratada previamente), por ejemplo, sobre una superficie o porción de la piel donde se mantiene esencialmente la integridad del estrato córneo. La invención demuestra ciertamente que, para evitar una respuesta inmunitaria Th2 sesgada, es importante mantener la integridad del estrato córneo y el estado de activación natural de los queratinocitos y células de Langerhans que están situadas por debajo del estrato córneo. Manteniendo esta integridad, la respuesta obtenida está altamente orientada en el sentido de tolerancia. Por consiguiente, aunque se puede realizar una limpieza suave de la superficie de la piel en el lugar de aplicación, por ejemplo, hidratación, limpieza con agua o una remoción simple muy suave, para eliminar, por ejemplo, corneocitos, la piel no debe ser tratada previamente para mantener la integridad sustancial del estrato córneo. En particular, no se debe realizar la remoción de cinta o abrasión fuerte de la piel, ya que tales pretratamientos alteran o eliminan todo o parte del estrato córneo y provocan la estimulación de queratinocitos. De forma similar, se debe evitar la perforación del estrato córneo.

- 40 Tal como se describe aquí, el término "vacunar" designa típicamente la administración secuencial de uno o más antígenos a un mamífero, para producir y/o aumentar una respuesta inmunitaria contra el(os) antígeno(s). La administración secuencial incluye una inmunización de iniciación seguida por una o varias inmunizaciones de estímulo.

- 45 Dentro del contexto de la presente invención, el término "patógeno" se refiere a cualquier agente que pueda causar una condición patológica. Ejemplos de "patógenos" incluyen, sin limitación, células (por ejemplo, células bacterianas, células de mamífero enfermo, células de cáncer de mamífero), hongos, parásitos, virus, priones o toxinas. Los patógenos preferidos son patógenos infecciosos. En una realización particular, el patógeno infeccioso es un virus, tal como el virus de la hepatitis, rotavirus, virus de la varicela, influenza, citomegalovirus, gripe, VIH, virus del Ébola o Rabia.

- 50 Ejemplos específicos de patógenos infecciosos incluyen, sin limitación, C. diphtheriae, C. tetani, B. Pertussis, Poliovirus, Paperas, Rubéola, Varicela, Streptococcus pneumoniae, Rotavirus, VPH (Virus del Papiloma Humano), Tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño), Antrax, Influenza aviar ("gripe aviaria"), Enfermedad de la úlcera de Buruli, Cólera, Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Dengue y fiebre hemorrágica del dengue, fiebre hemorrágica del Ebola, Enterovirus no polio, Haemophilus influenzae tipo B (HiB), Virus Hendra, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis D, Hepatitis E, Influenza (Estacional), Fiebre de Lassa, Legionelosis, Lepra, Malaria, Fiebre hemorrágica de Marburgo, Sarampión, Meningitis meningocócica, Virus de Nipah, Peste, Poliomieltitis, Fiebre del valle del Ritt, Viruela, Tuberculosis o Patógeno de la fiebre amarilla.

- 55 Un antígeno, como es usado aquí, designa cualquier molécula que puede causar una respuesta inmunitaria de células T o células B en un sujeto. Un antígeno específico para un patógeno es, típicamente, un elemento obtenido o derivado de dicho patógeno, que contiene un epítipo, y que puede causar una respuesta inmunitaria contra el patógeno. Dependiendo del agente patogénico, el antígeno puede ser de naturaleza diversa, tal como un (poli)

péptido, proteína, ácido nucleico, lípido, célula, etc. Formas debilitadas vivas de patógenos (por ejemplo, bacterias, virus), o formas muertas o inactivadas de los mismos pueden ser usadas, o material purificado del mismo, tales como proteínas, péptidos, lípidos, etc. El antígeno puede ser de origen natural o creado artificialmente. Puede ser exógeno para el mamífero tratado, o endógeno (por ejemplo, antígenos tumorales). El antígeno puede producirse por técnicas conocidas per se en la técnica, tales como por ejemplo tecnologías sintéticas o recombinantes, o enfoques enzimáticos.

Ejemplos específicos de antígenos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, antígenos virales, preferiblemente antígenos de superficie vírica, tales como, por ejemplo, antígeno del virus de Hepatitis B o A (HBsAg, HAsAg). Otros antígenos incluyen antígenos asociados a tumores, es decir, antígenos expresados por una célula tumoral pero no por células normales, proteínas bacterianas, etc.

En una realización particular, el antígeno es una proteína, polipéptido y/o péptido. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican también a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos pueden ser residuos modificados o no naturales, tal como un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente que se produce naturalmente. Debe entenderse que el término "proteína" también incluye fragmentos o variantes de diferentes antígenos, tales como fragmentos que contienen epítomos, o proteínas obtenidas de un patógeno y subsiguientemente modificadas enzimáticamente, químicamente, mecánicamente o térmicamente.

Como se expondrá más adelante, el antígeno puede estar en diversos estados, tales como líquido o seco. Típicamente, para la(s) aplicación(es) en la piel, el antígeno está en estado seco, mientras que para la vacunación convencional o iniciación, el antígeno está en forma líquida.

La invención describe nuevos métodos para mejorar la inmunidad preexistente en un sujeto mamífero usando la aplicación de un antígeno epicutáneo. La invención puede usarse para mejorar, estimular, reforzar, expandir y/o repolarizar una respuesta inmunitaria preexistente, la cual puede resultar de:

- vacunación convencional previa del sujeto contra un patógeno seleccionado;
- iniciación convencional previa del sujeto contra un patógeno seleccionado; y/o
- exposición natural del sujeto a un patógeno seleccionado.

En una primera realización, la invención reside así en el uso de un antígeno para estimular y preferiblemente polarizar por TH1 una respuesta inmunitaria existente contra un patógeno en un sujeto mamífero que ha recibido una vacuna convencional, administrándosele dicho antígeno al sujeto por aplicación(es) en la piel. La inmunidad preexistente puede ser resultado de una vacuna convencional realizada hace mucho tiempo en el sujeto, por ejemplo, durante la infancia. El período de tiempo entre la vacuna convencional y la administración en la piel puede variar sustancialmente, siempre y cuando el sujeto aún presente una inmunidad preexistente. La presencia de tal inmunidad preexistente puede comprobarse, en caso necesario, mediante métodos convencionales. Este método es adecuado, por ejemplo, en el caso de sujetos vacunados contra hepatitis o tétanos durante la infancia. El antígeno utilizado para el estímulo de la piel puede ser inactivo o una subunidad (por ejemplo, influenza, hepatitis B o A, tos ferina) o vivo atenuado (varicela, tuberculosis, poliomieltis, influenza, rabia, fiebre amarilla, etc.).

En otra realización, la invención reside en el uso de un antígeno para estimular y preferiblemente polarizar por TH1 una respuesta inmunitaria existente contra un patógeno en un sujeto mamífero que ha recibido una iniciación convencional, administrándosele dicho antígeno al sujeto mediante aplicación(es) en la piel. Como se ilustra en los ejemplos, los inventores han demostrado que la combinación de iniciación parenteral y estímulo cutáneo da como resultado una respuesta inmunitaria fuerte y orientada a Th1.

La invención también describe un método para vacunar a un sujeto contra un patógeno, que comprende una primera etapa de iniciación convencional del sujeto con un antígeno para causar o estimular una respuesta inmunitaria contra dicho patógeno, seguida por una etapa de estimulación de la respuesta inmunitaria por aplicación en la piel de un antígeno específico para el patógeno.

La iniciación puede comprender una o varias administraciones secuenciales de antígeno. En un método más típico, la iniciación convencional comprende una o dos administraciones de antígeno. La iniciación preferida es por inyección.

Para administración(es) convencional(es), el antígeno se combina típicamente con un adyuvante. Los adyuvantes adecuados incluyen cualquier sustancia que, por ejemplo, activa o acelera el sistema inmunológico para provocar una respuesta inmunitaria específica del antígeno mejorada. Ejemplos de adyuvantes que pueden usarse en la presente invención incluyen sales minerales, tales como fosfato de calcio, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio; ADN inmunestimulador o ARN, tales como oligonucleótidos CpG; Proteínas, tales como anticuerpos o proteínas de unión al receptor de tipo Toll; Saponinas, p. QS21; citoquinas; derivados muramyl dipéptidos; LPS; MPL y derivados incluyendo 3D-MPL; GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos); imiquimod;

partículas coloidales; Adyuvante de Freund completo o incompleto; adyuvante de Ribí o toxina bacteriana, por ejemplo, la toxina del cólera o enterotoxina (LT).

5 Para la iniciación convencional se utiliza una composición de antígeno de iniciación, la cual comprende el antígeno, típicamente en combinación con un adyuvante. Dicha composición está generalmente en forma líquida, adecuada para inyección. La composición puede comprender además excipientes adecuados, tales como un diluyente, un vehículo, una solución isotónica, agua, etc.

10 Como se ha indicado anteriormente, la invención combina la iniciación convencional o vacunación con estímulo cutáneo. La etapa de estímulo cutáneo comprende típicamente la aplicación de una preparación de antígeno sobre la piel del sujeto, bajo condiciones que permitan un contacto con la piel. La aplicación se realiza típicamente bajo condiciones y/o durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el antígeno penetre en el estrato córneo de la epidermis y/o alcance las células inmunes.

15 La aplicación en la piel se realiza preferiblemente utilizando un dispositivo adecuado para mantener el contacto entre la preparación de antígeno y la piel del sujeto. Dichos dispositivos incluyen, sin limitación, un parche, una cinta, un apósito, una hoja o cualquier otra forma conocida por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el dispositivo para la piel es un parche, incluso más preferiblemente un parche oclusivo. Los dispositivos de parche preferidos no alteran la integridad de la piel.

Los resultados presentados en la presente solicitud muestran que una pronunciada respuesta inmunitaria orientada a Th1 se produce cuando el estímulo de la piel se realiza utilizando un dispositivo de parche de piel oclusivo.

20 En la realización más preferida, el método de la invención utiliza un dispositivo de parche de piel tal como se describe en las solicitudes de patente internacionales WO 2002/071950 y WO 2007/122226.

Dicho dispositivo es oclusivo y está configurado para usar un antígeno en forma seca, manteniéndose el antígeno en el parche a través de fuerzas electrostáticas y/o fuerzas de Van der Waals, sin adición de adhesivo. La preparación y las características de tal dispositivo (denominado Viaskin®) se describen en detalle en las solicitudes citadas anteriormente.

25 Para el funcionamiento de la presente invención, es particularmente adecuado utilizar un dispositivo que comprende un soporte adaptado para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada, en el que el lado del soporte que da hacia la piel dentro de la cámara tiene el antígeno seco adherido a través de fuerzas electrostáticas y/o fuerzas de Van der Waals. Tras la aplicación a la piel, la humedad aumenta en la cámara, dando lugar a la disolución del antígeno y al contacto con la piel.

30 En otra realización preferida de la invención, el antígeno se aplica sobre la piel del mamífero usando un dispositivo de parche oclusivo que comprende un soporte al que está unido el antígeno. Preferiblemente, el antígeno está unido al soporte del parche a través de fuerzas electrostáticas o de Van der Waals, sin adición de adhesivo. En realizaciones particulares, el soporte del parche puede estar compuesto de vidrio o un polímero elegido del grupo que consiste en plásticos celulósicos (CA, CP), cloruro de polivinilo (PVC), polipropilenos, poliestirenos, poliuretanos, policarbonatos, poliacrílicos, poliolefinas, poliésteres, polietilenos y etileno vinil acrilatos (EVA).

35 En una realización más preferida, el estímulo de la piel se lleva a cabo utilizando una preparación de antígeno seco, que se aplica preferiblemente sobre la piel usando un dispositivo de piel electrostático. A este respecto, el término "seco" designa el hecho de que la preparación de antígeno de estímulo es sustancialmente en polvo, por ejemplo, en forma de partículas que pueden individualizarse o aglomerarse.

40 Aunque menos preferido, la preparación de antígeno de estímulo puede estar en forma líquida y aplicarse utilizando dispositivos conocidos, tales como dispositivos oclusivos que tienen un depósito o una membrana perforada.

En otra realización preferida, la invención combina una preparación de antígeno de iniciación con adyuvante líquido y una preparación de antígeno de estímulo seco.

45 Además, en una realización más preferida, la preparación de antígeno de estímulo se formula o se usa sin adyuvante. De hecho, la invención muestra que, incluso en ausencia de adyuvante añadido en la preparación de estímulo, el método conduce a una respuesta inmunitaria potente y polarizada por TH1.

En otra realización preferida, la invención combina así una preparación de antígeno de iniciación con adyuvante líquido, y una preparación de antígeno de estímulo, sin adyuvante, seca.

50 La preparación de antígeno de estímulo puede contener excipientes inertes u otros ingredientes, tales como potenciadores de penetración o reactivos de hidratación. Sin embargo, se prefiere utilizar una preparación de antígeno de estímulo que contenga, como única sustancia activa, uno o varios antígenos, es decir, desprovisto de otras sustancias activas tales como adyuvantes o potenciadores de penetración.

En la etapa de estímulo, uno o más dispositivos de parche pueden aplicarse, una o más veces, directamente a la piel intacta, sin ningún pretratamiento, preferiblemente sobre una parte sin pelo del cuerpo. De hecho, aunque

- abarcado por la presente solicitud, no se requiere tratar la piel antes de la aplicación del dispositivo. Además, la presente solicitud muestra sorprendentemente que el pretratamiento de la piel influye sustancialmente en el tipo de respuesta inmunitaria inducida por los estímulos epicutáneos. Más particularmente, cuando la preparación de antígeno es sin adyuvante y se aplica sobre piel intacta, la respuesta inmunitaria preexistente se amplifica fuertemente y se polariza por Th1. Esto fue totalmente inesperado y es particularmente ventajoso.
- Por lo tanto, la invención también describe un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno polarizado por Th1 en un sujeto, en el que el método comprende la aplicación, sobre una piel intacta del sujeto, de una preparación seca y sin adyuvante de dicho antígeno.
- La presente invención también describe una composición que comprende una preparación inyectable de un antígeno específico para un patógeno seleccionado y una preparación seca sin adyuvante de un antígeno específico para dicho patógeno seleccionado, para su aplicación secuencial separada a un sujeto mamífero.
- Esta invención también describe una composición, tal como se ha definido anteriormente, para su uso en la inducción, estimulación o amplificación de una respuesta inmunitaria específica de un patógeno, orientada a Th1, en un sujeto mamífero. La composición puede ser, como se ha definido anteriormente, para estimular una respuesta inmunitaria a una enfermedad seleccionada, en un sujeto mamífero.
- Esta invención también describe un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero convencionalmente inmunizado contra un patógeno, en el que el método comprende la aplicación sobre la piel de dicho sujeto, sin tratamiento previo y sin adyuvante añadido, de un antígeno específico para el patógeno, conduciendo tal aplicación a un estímulo de la respuesta inmunitaria.
- El término "inmunizado convencionalmente" significa que un mamífero ha sido previamente expuesto al antígeno (es decir, inicializado) mediante una administración convencional del mismo. Los resultados presentados por los inventores muestran sorprendentemente que un estímulo epicutáneo sin adyuvante y sin tratamiento previo de la piel conduce a una amplificación eficaz y orientación a Th1 de la respuesta inmunitaria previamente causada o estimulada por administración(es) convencional(es).
- En el desempeño de la presente invención, el antígeno o antígenos usados para iniciación y estímulo pueden ser iguales o diferentes, siempre que el antígeno o antígenos sean específicos para el patógeno seleccionado. Típicamente, el antígeno o antígenos usados para iniciación y estímulo contienen al menos un epítipo de células T y/o células B en común. Además, la cantidad de antígeno utilizada puede ser adaptada por el experto en la materia. Pueden realizarse etapas de iniciación después de las dosificaciones publicadas. Para la estimulación de acuerdo con la presente invención, la cantidad de antígeno en cada dispositivo de piel está típicamente en el rango de 0,1 a 10000 µg, preferiblemente de 20 a 5000 µg.
- La inmunización por estímulo del método de la invención puede comprender una o varias aplicaciones de la estimulación, que pueden realizarse usando los mismos o distintos antígenos, preferiblemente el mismo antígeno, a diferentes intervalos de tiempo, dependiendo del sujeto, el antígeno, el dispositivo de piel, La enfermedad, etc.
- En una realización particular, cada estímulo de antígeno comprende entre 1 y 10 aplicaciones secuenciales de un dispositivo de piel, típicamente entre 1 y 5, preferiblemente 1, 2 o 3, durante un período de tiempo que puede extenderse desde 1 día hasta varios meses. Cada aplicación puede ser separada de otra de 1 día a varias semanas, típicamente de 1 a 10 semanas.
- Además, un tratamiento preferido de la invención comprende típicamente 1, 2 o 3 estímulos de antígeno.
- El primer estímulo de antígeno puede hacerse en cualquier momento después de la iniciación o exposición al patógeno, siempre que las células inmunológicas específicas del antígeno estén todavía presentes. Preferiblemente, la primera estimulación se realiza entre 2 a 10 semanas después de la iniciación.
- En una realización particular, la invención se refiere, por lo tanto, a una inmunización primaria convencional seguida, típicamente de 3 a 6 semanas después, por una única inmunización de estímulo de antígeno.
- Si es necesario, se puede realizar un segundo y, opcionalmente, un tercer estímulo de antígeno. El segundo y tercer estímulos se pueden realizar dentro de intervalos de tiempo mensual, por ejemplo entre 2 y 18 meses después del estímulo previo.
- A este respecto, en una realización particular, la invención se refiere a una inmunización primaria convencional seguida, típicamente de 3 a 6 semanas después, por un primer estímulo de antígeno y, típicamente de 1 a 18 meses más tarde, preferiblemente de 1 a 12 meses después, por ejemplo, 3 -6 semanas más tarde, mediante un segundo estímulo de antígeno.
- En otra realización particular, la invención se refiere a (i) una inmunización primaria convencional, (ii) típicamente de 3 a 6 semanas después, un primer estímulo de antígeno, (iii) típicamente de 1 a 18 meses más tarde, preferiblemente de 1 a 12 meses después, por ejemplo, de 3 a 6 semanas más tarde, un segundo estímulo de

antígeno, y (iv) típicamente de 1 a 18 meses después, preferiblemente de 1 a 12 meses más tarde, por ejemplo, de 3 a 6 semanas después, un tercer y último estímulo de antígeno.

La dosis específica de antígeno así como el número de aplicaciones de estímulo y la duración del contacto pueden ser adaptadas por el experto en la técnica, dependiendo del sujeto, la naturaleza de la preparación de antígeno, el tipo de dispositivo de parche utilizado, etc. Para un dispositivo oclusivo, tal como un dispositivo Viaskin®, la duración del contacto está preferiblemente comprendida entre 5 y 72 horas. Preferiblemente, para cada aplicación, el dispositivo se mantiene sobre la piel durante un periodo de 24 a aproximadamente 60 horas, más preferentemente de aproximadamente 24 horas a 48 horas, típicamente durante 24 horas, 36 horas o 48 horas.

El tratamiento puede ser detenido en cualquier momento, por ejemplo, una vez que se ha establecido una suficiente amplificación y/u orientación a Th1 de la respuesta inmunitaria. A este respecto, la presente invención muestra que una reacción inmunológica específica provocada por iniciación parenteral, que está orientada a Th2, puede amplificarse eficazmente y polarizar por Th1 tras el estímulo epicutáneo. Las células Th1 y Th2 son dos tipos de linfocitos T auxiliares CD4+ que difieren en su patrón de producción de citoquinas. Las células Th1 producen IFN- γ , IL-2 y TNF- β y están implicadas en respuestas inmunológicas mediadas por células que son beneficiosas en la defensa del huésped frente a patógenos intracelulares y células malignas. Las células TH2 secretan IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, que aumentan las respuestas de anticuerpos, incluyendo la producción de IgE. Las respuestas Th1 y Th2 son mutuamente antagonistas, de manera que normalmente existen en equilibrio y se regulan mutuamente entre sí.

En el contexto de esta invención, una orientación a Th1 de la respuesta inmunitaria significa que la relación de células inmunológicas Th1/Th2 o citoquinas aumenta, preferiblemente en por lo menos un 10%, como resultado de la estimulación de la presente invención.

Tal como se describe en la sección experimental, un sobrenadante de células T, extraído de sujetos estimulados de acuerdo con la invención, contiene concentraciones significativamente más altas de IFN- γ (que es la citoquina Th1 principal) y concentraciones significativamente más bajas de IL-5, en comparación con sujetos estimulados por la vía convencional de administración, demostrando así una orientación a Th1 de la respuesta inmunitaria. La orientación a Th1 indica, en una realización específica, que la concentración de IFN- γ , o el número de células productoras de IFN- γ , aumenta en por lo menos un 10% en comparación con los sujetos tratados usando la vía de administración convencional, y/o que la concentración de IL-5, o el número de células productoras de IL-5, disminuye en por lo menos un 10% en comparación con los sujetos tratados usando la vía convencional de administración.

Esta invención también describe un método de amplificación y orientación a Th1 de una respuesta inmunitaria contra un patógeno en un sujeto mamífero inmunizado convencionalmente, en el que el método comprende la aplicación, sobre la piel de dicho sujeto inmunizado parenteralmente, de un antígeno específico para el patógeno, sin adyuvante añadido.

La invención también describe un método de amplificación y orientación a Th1 de una respuesta inmunitaria contra un patógeno en un sujeto mamífero inmunizado convencionalmente, en el que el método comprende la aplicación, en la piel sin tratamiento previo de dicho sujeto inmunizado parenteralmente, de un antígeno específico para el patógeno, sin adyuvante añadido.

Los siguientes ejemplos son dados a título ilustrativo y no limitativo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Amplificación y orientación a TH1 de la respuesta inmunitaria mediante estimulación de la piel

A. Material y métodos

Animales

Se adquirieron ratones BALB/c adultos de Charles River Laboratories (Francia). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas de la Comunidad Europea sobre cuidado de los animales.

Antígeno

Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, es decir, HBsAg

Dispositivo para la piel

Dispositivo Viaskin®, tal como se describe en el documento WO 2007/122226. El dispositivo es oclusivo y electrostático. El antígeno se mantiene en la superficie del soporte de respaldo, en forma seca y sin adyuvante, a través de fuerzas electrostáticas.

Cuantificación de IgE, IgG1, IgG2a específicas

Se recogieron muestras de sangre de plexo venoso retro-orbital antes y durante la inmunoterapia y el plasma se almacenó a -30°C hasta nuevos análisis.

- 5 Se utilizó un ELISA cualitativo, validado, usando las directrices de ICH, para IgG1 e IgG2a específicas. Brevemente, las placas de microtitulación se recubrieron con HBsAg a una concentración de 2 µg/ml. Se distribuyeron diluciones en serie de 100 µl de cada suero por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 4°C. Se utilizó como marcador un anticuerpo anti-ratón IgG1 o IgG2a marcado con peroxidasa. Se utilizó el Reactivo (TMB) como sustrato enzimático. Se trazaron las curvas de dilución y se determinó la titulación del suero en la misma ordenada (eje y).

Producción de citoquinas

- 10 Después del último muestreo de sangre, los ratones fueron sacrificados por dislocación vertebral y los bazo se recogieron en condiciones estériles.

Cuantificación ELISA

- 15 El cultivo celular se realizó en presencia de HBsAg (0 - 50 µg.ml⁻¹) en placas de microtitulación de 24 pocillos (2.10⁶ células/pocillo). Después de 72 horas de estimulación in vitro, los sobrenadantes fueron recogidos y la cuantificación de IL-5 e IFNγ se ensayaron utilizando conjuntos (kits) CytoSet™ (BioSource International Europe, Bélgica) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

ELISpot

El cultivo celular se realizó en presencia de HBsAg (0 - 50 µg.ml⁻¹), en placas de microtitulación ELISpot (sistema R&D, EE.UU.) según la recomendación del fabricante (BD, EE.UU.). La cuantificación de IL-5 e IFNγ se determinó después de 48 horas de intro estimulación.

- 20 Protocolo

• **Iniciación:** se inmunizaron convencionalmente (por inyección i.m.) ratones BALB/C adultos (2 grupos de 7) con 2 mg HBsAg/10 µg AIOH

• **Día 28 post-iniciación**

- Suero recolectado

- 25 - Grupo 1 "HBsAg/Alum": estímulo con 2mg de HBsAg/10 µg de AIOH

- Grupo 2 "Parches Viaskin®/HBsAg": estímulo con Viaskin® cargado con 100mg de HBsAg. El Viaskin® se retiró 48 horas después de la aplicación.

• **Día 49 post-iniciación** (21 días después del post-estímulo I)

• Suero recolectado

- 30 • Grupo 1: sin estímulo

• Grupo 2: estímulo con Viaskin® cargado con 100mg de HBsAg

Los parches para el estímulo 1 y el estímulo 2 se prepararon con 2 métodos diferentes: Para el estímulo 1, se prepararon parches por liofilización y para el estímulo 2, los parches se prepararon por secado. Sin embargo, en las dos preparaciones el antígeno es cargado como polvo en los parches.

- 35 • **Día 63 post-iniciación** (14 días después del post estímulo II)

• Suero recolectado

Los bazo se tomaron para el análisis de las respuestas de células T

• **Cuantificación de anticuerpos:** se cuantificaron los anticuerpos anti-HBsAg en suero (IgG1 e IgG2a) mediante ELISA utilizando placas revestidas con antígeno los días 0, 28, 49 y 63.

- 40 • **Respuestas de células T:**

Ex vivo:

- Los esplenocitos se cultivaron con o sin HBsAg (5 mg/ml) durante 1 hora antes de la adición de Brefeldin A/monensina, para bloquear la secreción de citoquinas.

- 45 - Después de 6 horas adicionales de cultivo, las células se tiñeron con anticuerpos contra moléculas de superficie, luego se fijaron y permeabilizaron antes de la tinción con anticuerpos contra IL-5, IL-2, IFN-γ.

- Resultados (no mostrados): no se detectaron células productoras de citoquinas por encima del fondo en ningún grupo experimental (excepto en esplenocitos de control estimulados con mitógenos)

Después de la re-estimulación in vitro:

- Los esplenocitos se cultivaron con o sin antígeno (5mg/ml y 20 mg/ml) antes de los análisis durante 72 horas.

- 5 • IL-5 e IFN-g productores de esplenocitos fueron cuantificados por ELISpot después de 48 horas de cultivo con o sin HBsAg.
- La secreción de citoquinas se determinó en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA después de 72 horas de cultivo con o sin HBsAg.

Análisis estadístico

- 10 El software *Graph Pad* (San Diego, EE.UU.) se utilizó para el análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y test de Dunnett cuando se compararon ratones tratados con controles, o utilizando el ANOVA y el test de Tukey cuando se compararon todos los grupos entre sí.

B. Resultados

Influencia del estímulo epicutáneo de la invención sobre las respuestas de IgG1 anti-HBsAg (Fig. 1)

- 15 Los resultados presentados muestran un aumento significativo de IgG1 por la primera aplicación de parche de piel (ver Fig. 1, comparación de D49 y D28).

Influencia del estímulo epicutáneo de la invención sobre las respuestas de IgG2a anti-HBsAg (Fig. 2)

Los resultados presentados muestran un aumento significativo de IgG2a por la primera aplicación de parche de piel (ver Fig. 1, comparación de D49 y D28).

- 20 Las células productoras de citoquina en ratones aumentaron dos veces con el estímulo epicutáneo de la invención o HBsAg/AIOH (ELISpot) (Fig. 3)

Los resultados presentados en la Fig. 3 muestran que el número de células productoras de IFN-γ es similar en ratones potenciados con Viaskin® o inyección intramuscular con adyuvante, mientras que las células productoras de IL-5 son menos en ratones estimulados con Viaskin®. Por tanto, a pesar de una iniciación inducida por Th2 con HBsAg/AIOH, la estimulación por Viaskin® provocó respuestas equilibradas Th1/Th2, contrastando con la respuesta Th2 preferente de HBsAg/AIOH (por inyección intramuscular).

- 25 Sección de citoquinas en ratones estimulados dos veces con el estímulo epicutáneo de la invención o HBsAg/AIOH (ELISA) (Fig. 4)

A las 72 horas, IFN-γ está presente en concentraciones significativamente más altas e IL-5 en concentraciones significativamente más bajas en el sobrenadante de células T de ratones estimulados con Viaskin que con HBsAg/AIOH (por inyección intramuscular).

Las respuestas de IL-5 en ratones estimulados dos veces con el estímulo epicutáneo de la invención o HBsAg/AIOH (detalles de ELISA-ELISpot)

- 35 • A las 72 horas, IL-5 está presente en concentraciones más altas en ratones estimulados con Viaskin®, que en ratones imolutos.

• A las 72 horas, IL-5 está presente en concentraciones significativamente más bajas en ratones estimulados con Viaskin® que con HBsAg/AIOH.

• Se observa el mismo patrón independientemente de las condiciones de re-estimulación (in vitro con la cuantificación ELISA de in vitro por ELISpot).

- 40 Las respuestas de IFN-g en ratones estimulados dos veces con el estímulo epicutáneo de la invención o HbsAg/AIOH (detalles de ELISA, ELISpot)

• Los esplenocitos de ratones inmunes liberan espontáneamente IFN-g, y esta liberación fue mayor en ratones estimulados con Viaskin®.

• Si esta liberación espontánea se resta:

- 45 • IFN-γ no se detecta en concentraciones significativamente más altas en ratones estimulados con HBsAg/AIOH que en ratones imolutos.

- IFN- γ se detecta en concentraciones significativamente más altas en ratones estimulados con Viaskin® que en ratones impolutos.

C. conclusiones

- 5 El estímulo de la piel de la invención aumentó significativamente las respuestas de IgG1 e IgG2a anti-HBsAg en ratones convencionalmente inicializados con HBsAg/AlOH. Los niveles de IgG1 e IgG2a fueron similares a los obtenidos por estimulación convencional (inyección intramuscular con adyuvante). La estimulación de la piel determinó el aumento de IFN- γ y la reducción de respuestas anti-HBsAg IL-5.

Estos resultados demuestran, in vivo, una amplificación exitosa y una re polarización de Th1 de las respuestas de tipo Th2 provocadas por la iniciación HBsAg/AlOH convencional.

- 10 Ejemplo 2: Efecto del pretratamiento de la piel sobre el tipo de respuesta inmunitaria

A. Materiales y métodos

Los ratones BALB/c se sensibilizaron intragástricamente a un extracto de proteína de cacahuete (PPE) mezclado con la toxina del cólera como adyuvante durante 6 semanas (una vez a la semana).

- 15 A continuación, se realizó una inmunoterapia durante 8 semanas consecutivas. 10 ratones sensibilizados se trataron epicutáneamente sobre piel intacta. 10 ratones sensibilizados se trataron epicutáneamente sobre piel pretratada por 10 remociones de cinta. La remoción de cinta consistió en 10 decapados con un adhesivo, lo que condujo a una alteración sustancial de la integridad del estrato córneo. 10 ratones sensibilizados no fueron tratados. 10 ratones impolutos sirvieron como controles.

- 20 Al final de la inmunoterapia, todos los ratones fueron expuestos a un régimen sostenido de 10 días de cacahuete oral. Después del sacrificio, las lesiones fueron evaluadas en el esófago y yeyuno mediante análisis histológico. La expresión de mRNA de Th1, Th2 y citoquinas Treg se midieron por TR-qPCR.

Las mediciones de las respuestas serológicas (IgE, IgG1 e IgG2a específicas) se realizaron por ELISA, antes y al final de la inmunoterapia.

B. Resultados

- 25 Después del tratamiento epicutáneo en piel intacta, sIgE disminuyó y sIgG2a aumentó, respectivamente $0,036 \pm 0,01$ vs $0,231 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ (EPIT vs simulada, $p < 0,05$) y $2,86 \pm 0,78$ vs $1,06 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$). Por el contrario, después de la inmunoterapia en piel con remoción de cinta, sIgE aumentó y sIgG2a no se modificó, respectivamente $0,383 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0,01$ vs simulada) y $1,252 \pm 0,22 \mu\text{g/ml}$ (ver las Figuras 7A y 7B).

- 30 Los resultados también muestran que la concentración eosinofílica en el esófago en la mucosa fue sustancialmente mayor en ratones tratados con piel simulada y desnuda, $19,9 \pm 1,5$ y $26,7 \pm 8,7$, que los ratones tratados con piel intacta, $2,7 \pm 0,9$ ($p < 0,01$ y $p < 0,05$) e Impoluta, $1,1 \pm 0,7$ células/ mm^2 ($p < 0,01$) (véase la Fig. 8). Además, las expresiones de eotaxina, IL-5 y mRNA de IL-13 se redujeron significativamente mediante tratamiento epicutáneo en piel intacta (respectivamente 1,14, 1,35, 1,02) en comparación con la simulada (2,57, 2,60, 2,50, $p < 0,05$) y tratamiento de remoción de cinta (2,02, 1,95, 2,01, $p < 0,05$) (véanse las figuras 9A, B y C).

- 35 Curiosamente, el mRNA de GATA-3, que es un factor de transcripción Th2, disminuyó significativamente en ratones tratados con piel intacta en comparación con el grupo simulada ($p < 0,05$), tal como se muestra en la Fig. 10A. Además, Foxp3, un factor de transcripción Treg, se incrementó significativamente en los ratones tratados sobre piel intacta, en comparación con la simulada ($p > 0,05$) y piel desnuda ($p < 0,001$) (ver Fig. 10B).

- 40 Por último, como se muestra en la Fig. 11, la relación vellosidad/crítica duodenal fue significativamente menor en simulada ($2,1 \pm 0,2$) y en ratones tratados remoción de cinta ($2,4 \pm 0,3$) que en piel intacta tratada ($2,9 \pm 0,2$) ($p < 0,05$) y ratones ($p < 0,001$ y $p < 0,05$) Impolutos ($3,3 \pm 0,1$).

C. Discusión

Los resultados obtenidos muestran que en la inmunoterapia epicutánea el perfil de la respuesta inmunitaria provocada depende del nivel de integridad del estrato córneo:

- 45 En piel intacta, se induce una disminución de IgE/aumento de IgG2a

En la piel tratada con estrato córneo alterado: se induce un aumento de IgE/no IgG2a.

También, después de una dieta exclusivamente de cacahuete: la alta infiltración de eosinófilos fue observada solamente en los ratones tratados sobre piel desnuda.

Conclusiones

Los resultados muestran que una respuesta inmunitaria eficaz puede obtenerse y amplificarse por terapia epicutánea usando estimulantes de antígeno sin adyuvantes aplicados usando un dispositivo oclusivo. El estímulo causa una respuesta inmunitaria Th1 orientada y particularmente fuerte cuando el antígeno se aplica sobre la piel intacta.

Referencias bibliográficas

Glenn, Scharton-Kersten et al. 1999, "Advances in vaccine delivery: transcutaneous immunization." *Expert Opin Investig Drugs* 8(6): 797-805;

Kaiserlian and Etchart 1999 "Epicutaneous and transcutaneous immunization using DNA or proteins." *Eur J Dermatol* 9(3): 169-76;

Partidos, Beignon et al. 2003, "Delivering vaccines into the skin without needles and syringes." *Expert Rev Vaccines* 2(6): 753-61; "Immunity under the skin: potential application for topical delivery of vaccines." *Vaccine* 21(7-8): 776-80).

Shiver, JW et al., 2002, Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity." *Nature* 415: 331-335.

Woodland DL et al., 2004, "Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age." *Trends Immunol.* 25: 98-104.

Wu, L et al., 2005, "Enhanced breadth of CD4 T-cell immunity by DNA prime and adenovirus boost immunization to human immunodeficiency virus Env and Gag immunogens." *J Virol* 79: 8024-8031.

McConnell et al., 2007, "Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against Anthrax." *Molecular Therapy* 15: 203-210.

REIVINDICACIONES

1. La preparación de un antígeno específico para un patógeno infeccioso, para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente contra dicho patógeno en un sujeto mamífero, en el que dicha respuesta inmunitaria preexistente resulta de la previa inmunización parenteral o vacunación del sujeto contra dicho patógeno,
5 en la que dicha preparación de antígeno es sin adyuvante y se aplica a la piel intacta del sujeto con un dispositivo de parche de piel, y en el que dicha respuesta inmunitaria amplificada está orientada a Th1.
2. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de la reivindicación 1, en la que dicha preparación de antígeno es seca.
3. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de la
10 reivindicación 1, en la que dicha preparación de antígeno se aplica a la piel del sujeto después de la limpieza de la superficie de la piel en el lugar de aplicación para eliminar los corneocitos.
4. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicha preparación de antígeno se aplica sobre un área sin tratamiento previo de la piel que tiene un estrato córneo sustancialmente no alterado.
5. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de
15 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha preparación de antígeno se aplica sobre la piel del sujeto usando un dispositivo de parche oclusivo.
6. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de la reivindicación 5, en la que el dispositivo de parche oclusivo comprende un soporte al que se une el antígeno
20 mediante fuerzas electrostáticas o de Van der Waals sin adición de adhesivo.
7. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho antígeno se administra como 1, 2 o 3 estímulos de antígeno de piel al sujeto.
8. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de la
25 reivindicación 7, que comprende un primer estímulo de antígeno de piel de 2 a 8 semanas después de la iniciación, opcionalmente un segundo estímulo de antígeno de piel de 1 a 12 meses después de la primera estimulación y, opcionalmente, un tercer estímulo de antígeno de piel de 1 a 12 meses después de la segunda estimulación.
9. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de
30 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que se utiliza el mismo antígeno para el estímulo de la piel y la previa iniciación o vacunación.
10. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, en la que el patógeno infeccioso es un virus, una bacteria, un parásito o un hongo.
11. La preparación de antígeno para su uso en la amplificación de una respuesta inmunitaria preexistente de
35 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el antígeno es un antígeno de superficie viral o bacteriana.
12. Una preparación de antígeno sin adyuvante específico para un patógeno infeccioso, para su uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero pre-inmunizado contra dicho patógeno por iniciación o vacunación parenteral, aplicándose la preparación de antígeno en su forma seca sobre la piel intacta de
40 dicho sujeto, cuya aplicación provoca una amplificación y una orientación a Th1 de la respuesta inmunitaria aumentando en por lo menos un 10% la relación de células inmunes Th1/Th2 o citoquinas.
13. Una preparación de antígeno sin adyuvante específico para un patógeno infeccioso, para su uso en un método para inducir o estimular una respuesta inmunitaria orientada a Th1 por patógeno específico en un sujeto mamífero, en el que el método que comprende:
45 - administrar parenteralmente al mamífero un antígeno específico para que el patógeno provoque o estimule una respuesta inmunitaria contra dicho patógeno, y
- aplicar subsecuentemente sobre piel intacta del mamífero un antígeno específico para el patógeno, permitiendo la amplificación de una respuesta inmunitaria orientada a Th1.

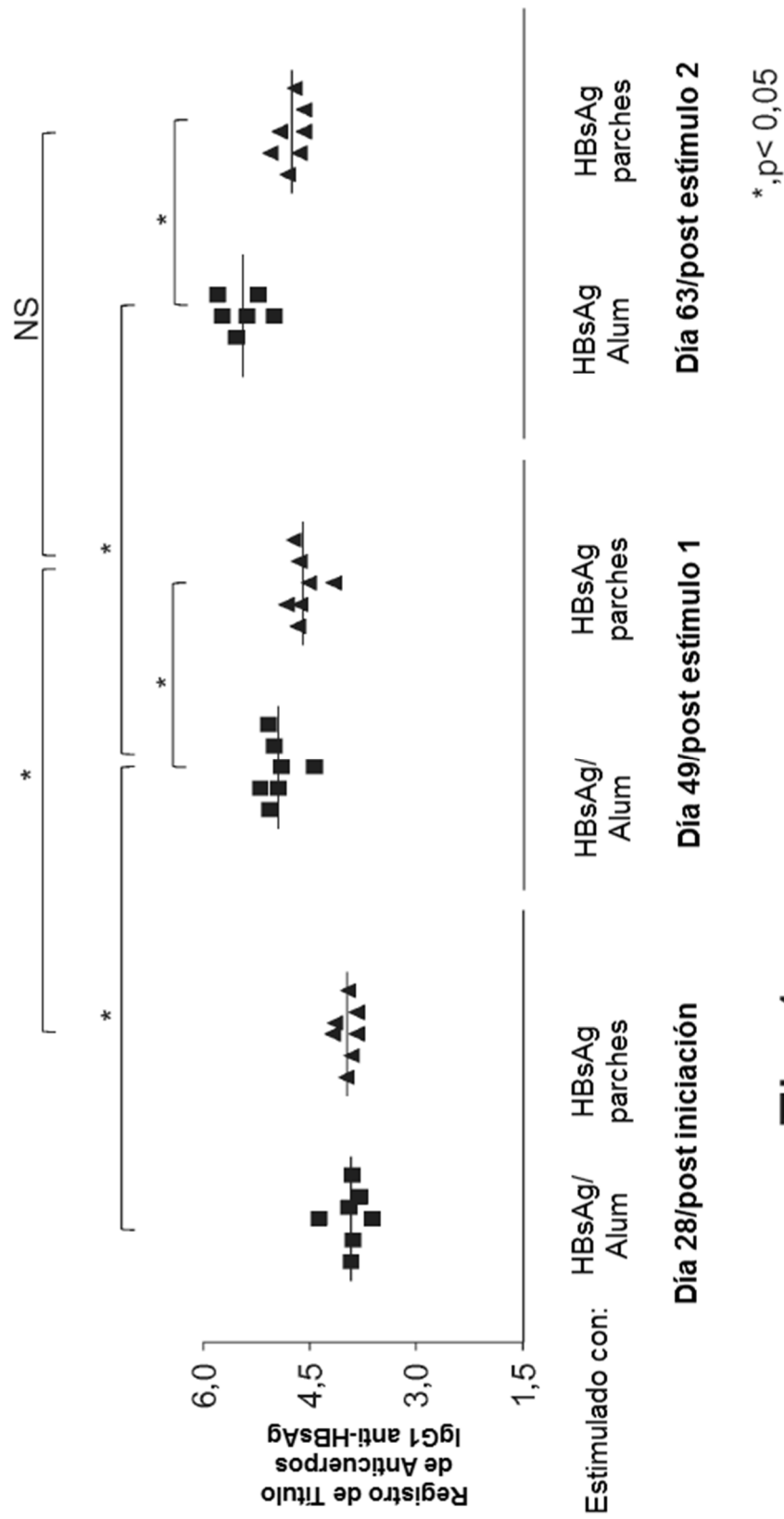


Fig. 1.

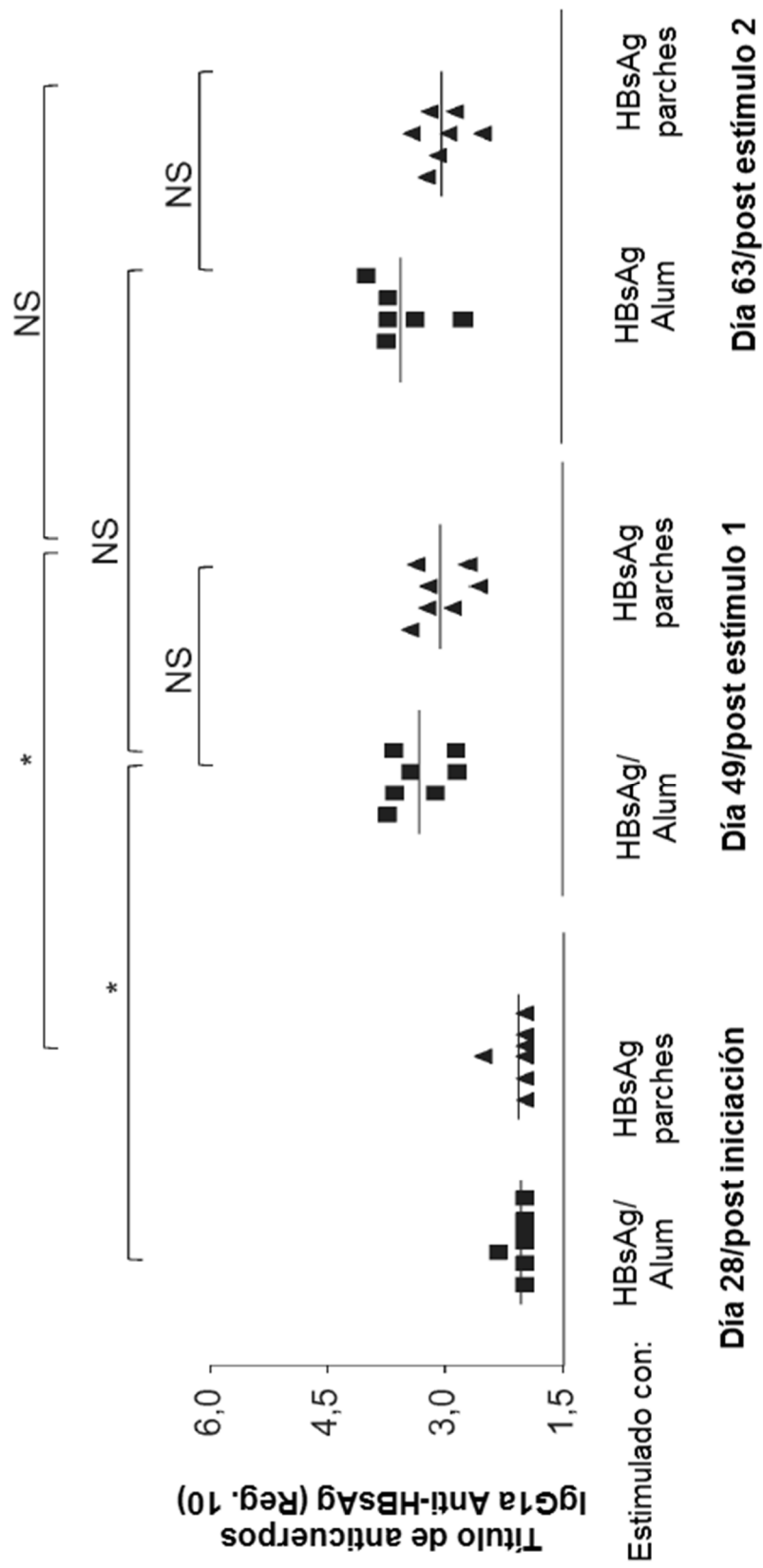


Fig. 2.

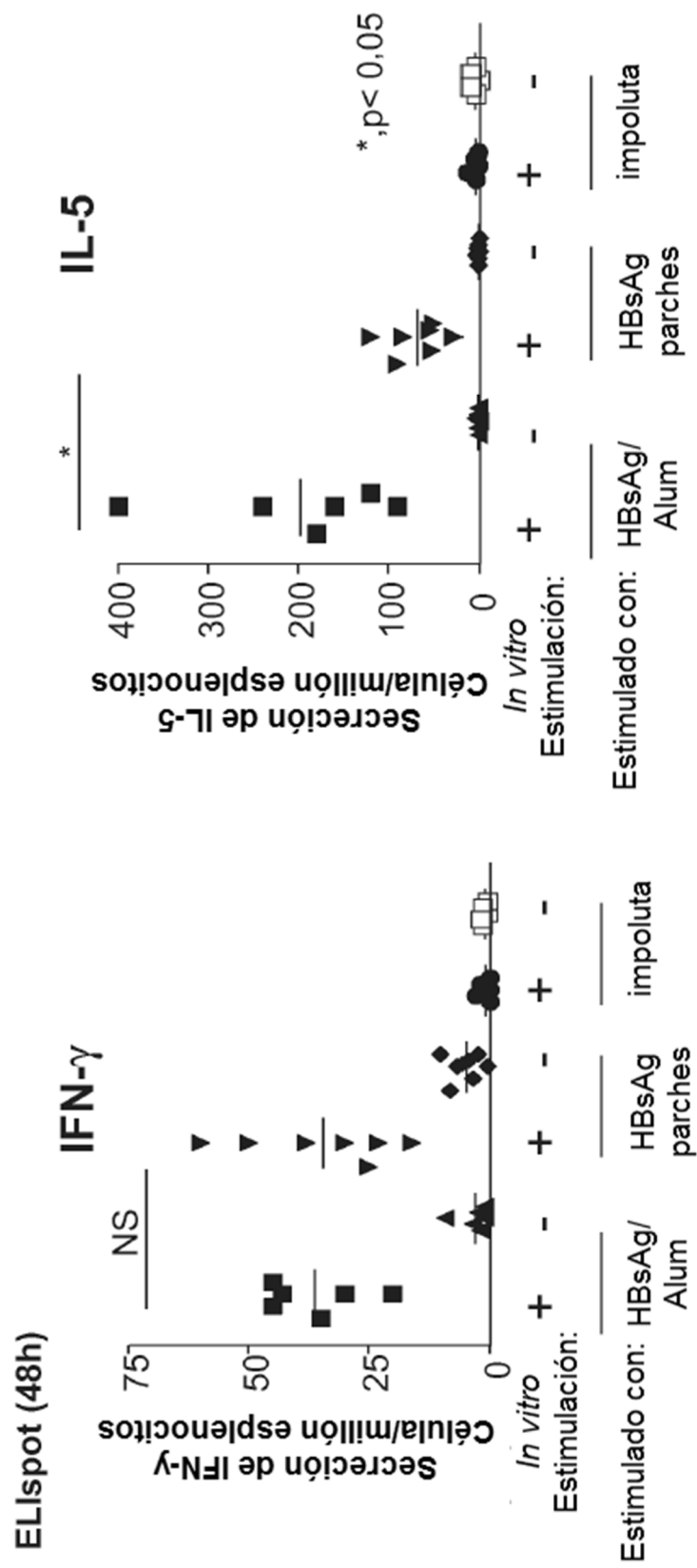


Fig. 3.

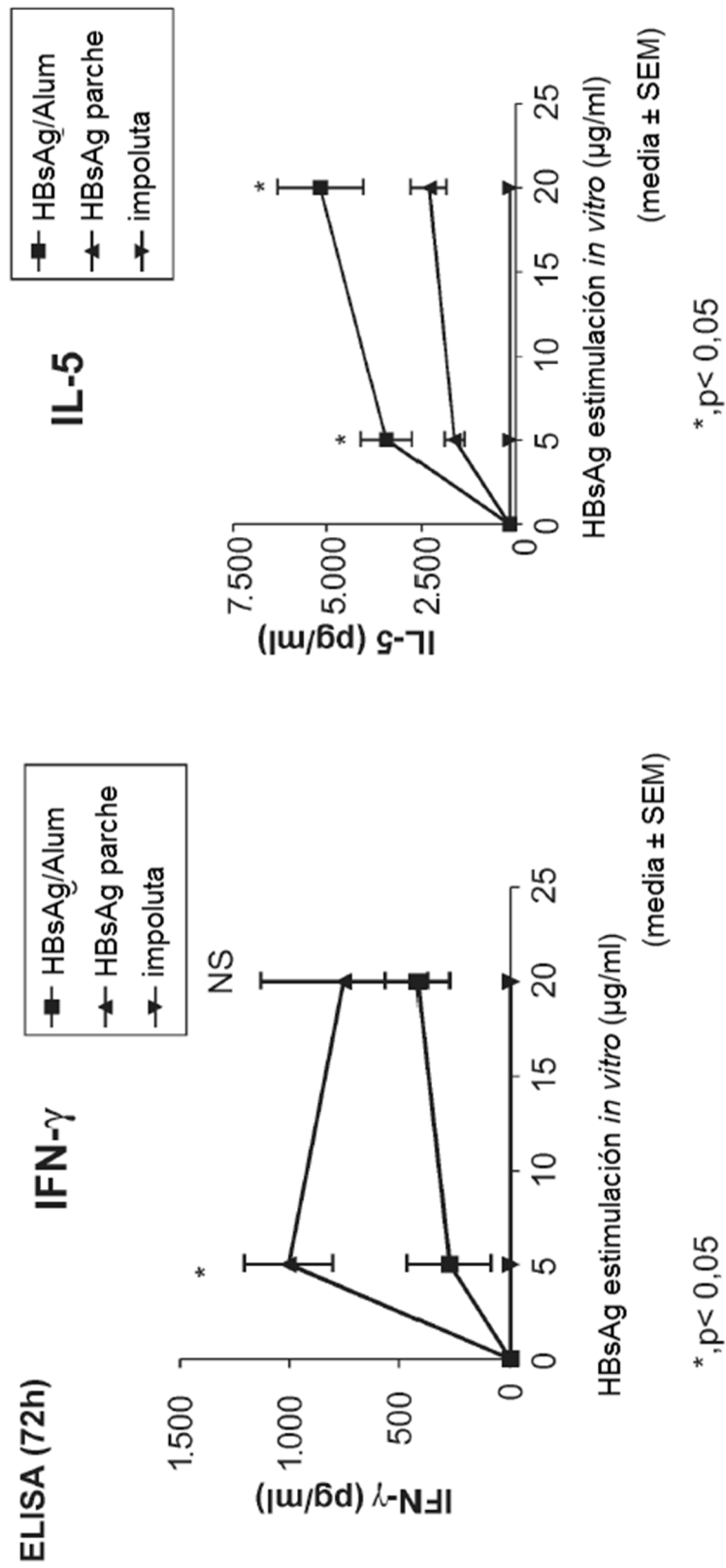


Fig. 4.

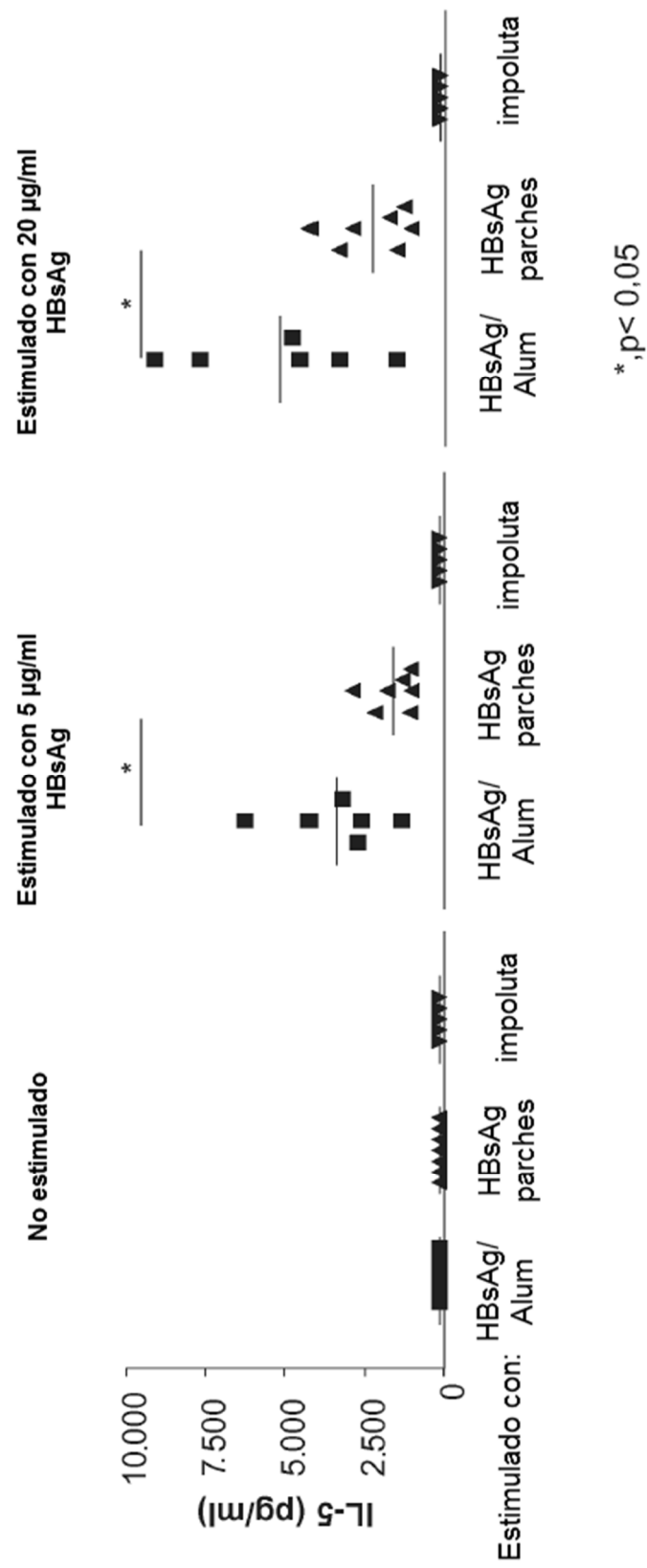


Fig. 5.

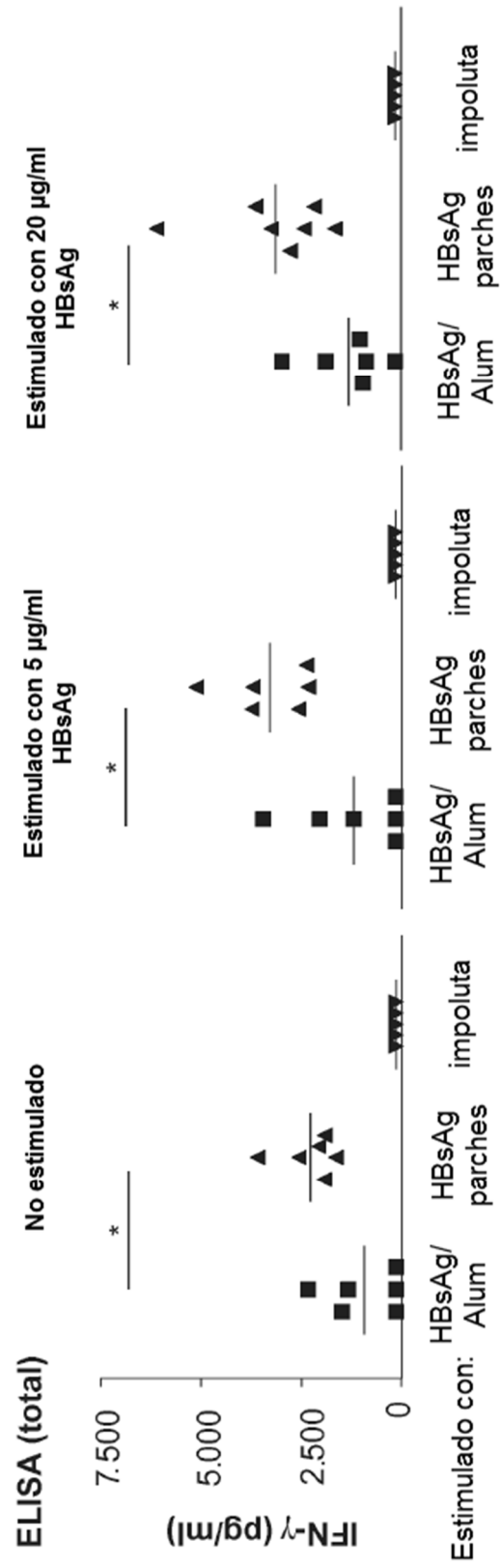


Fig. 6.

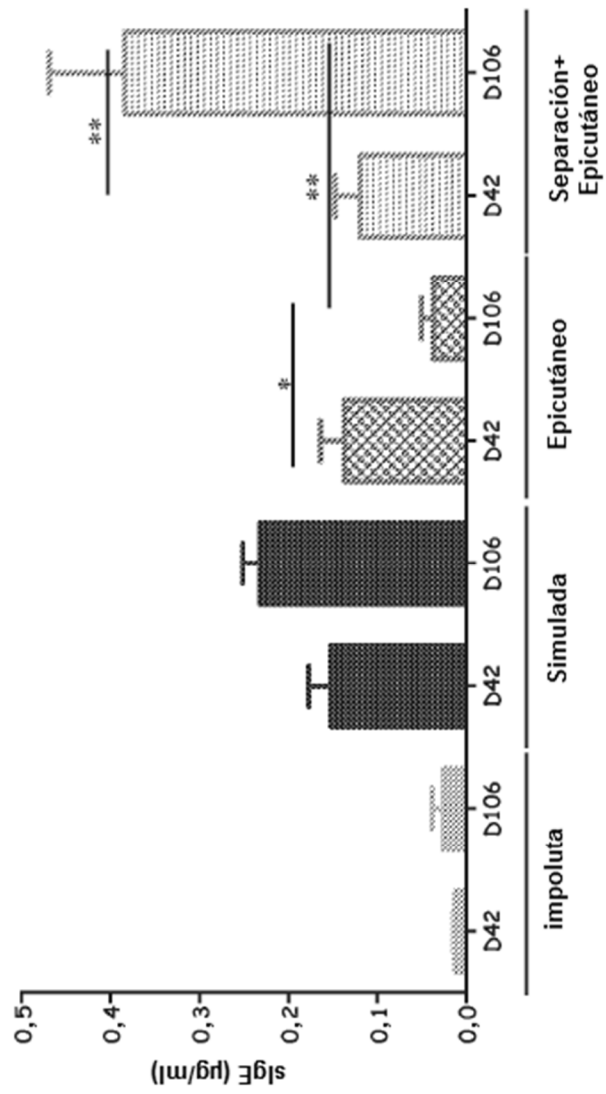


Fig. 7A

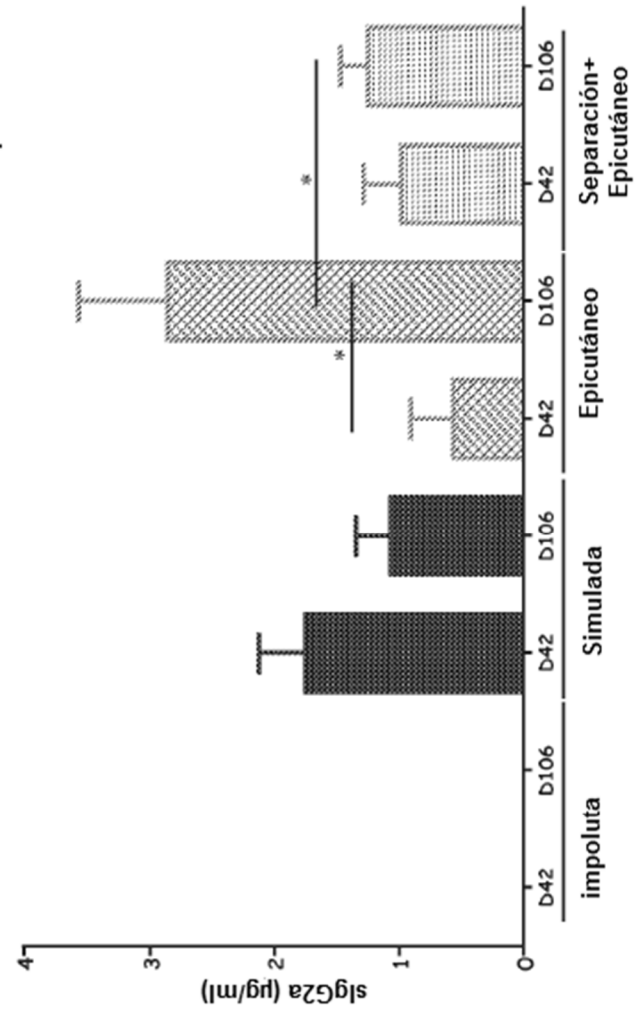


Fig. 7B

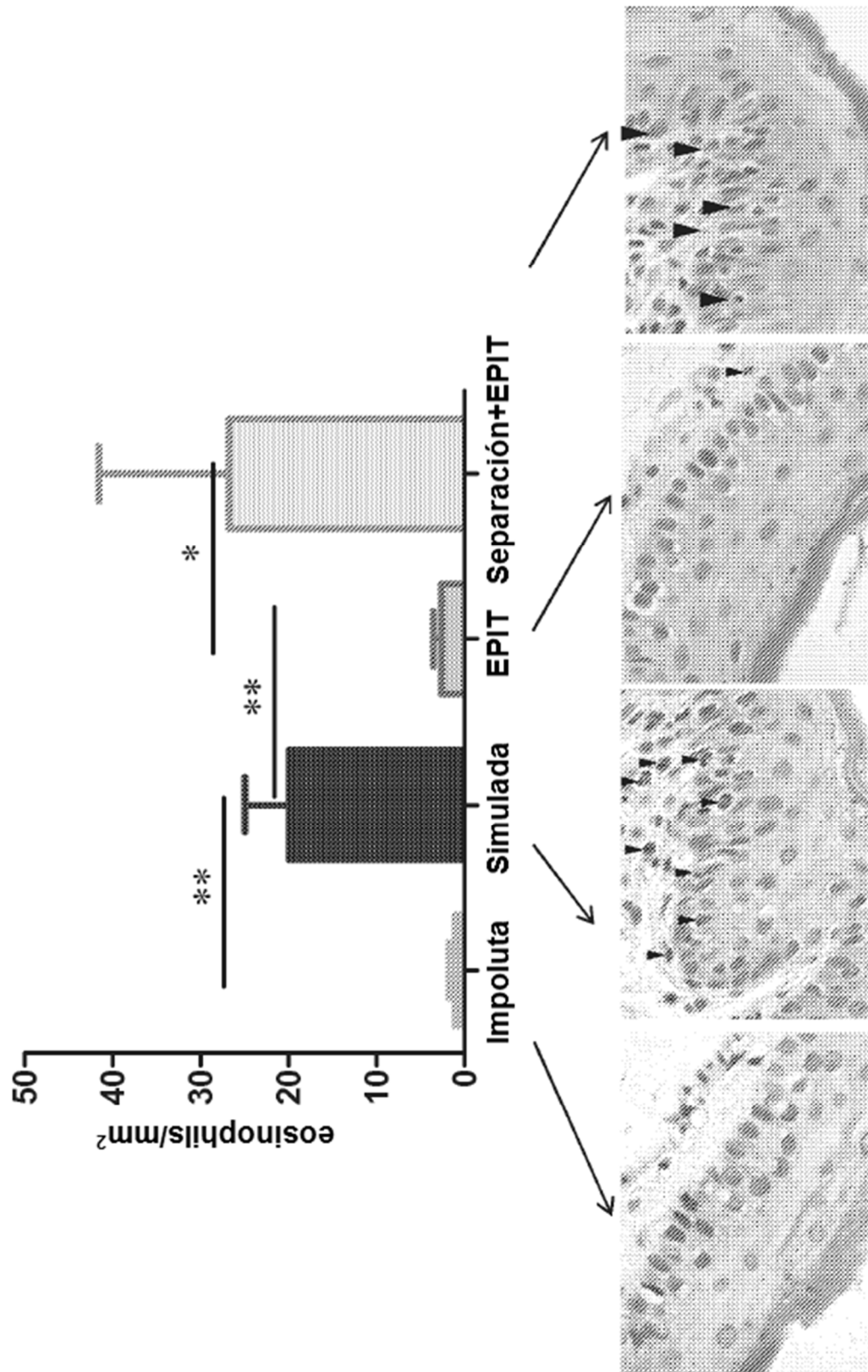


Fig. 8.

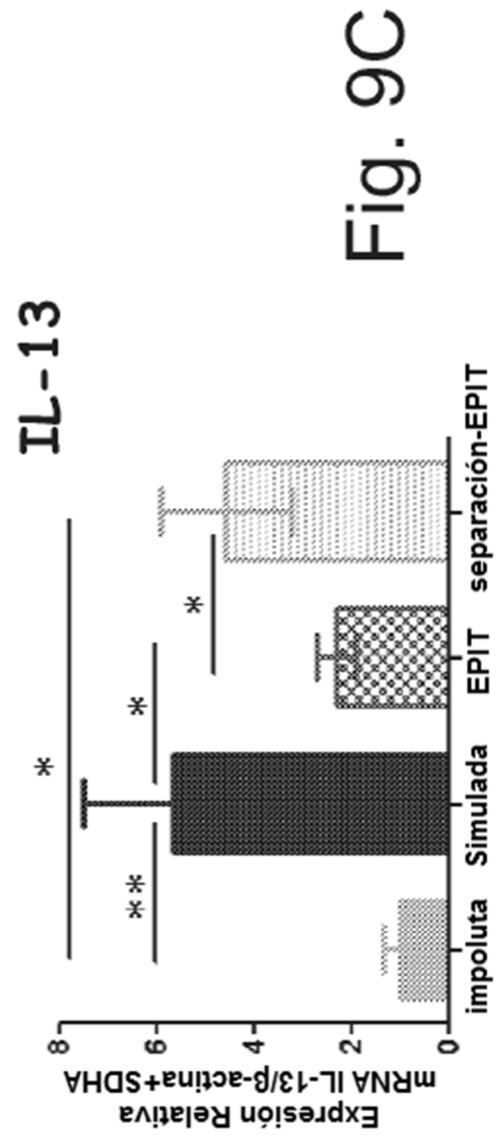
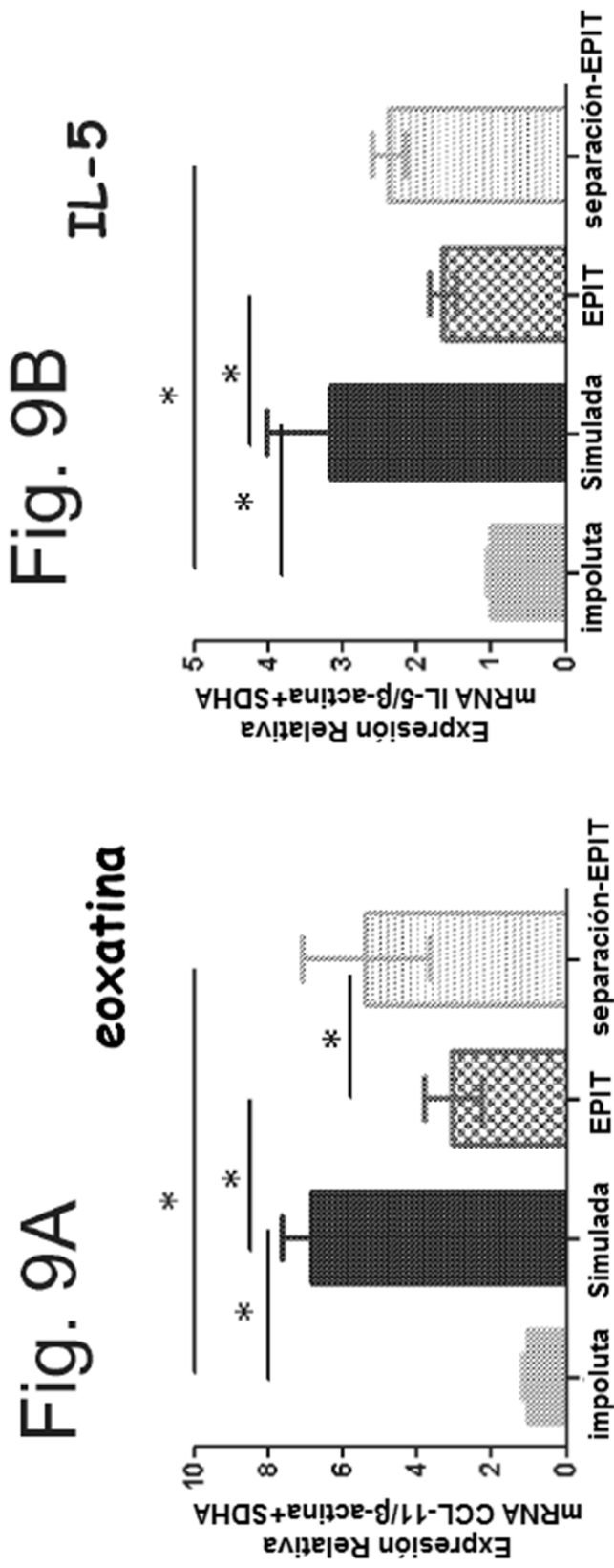


Fig. 10A

GATA-3

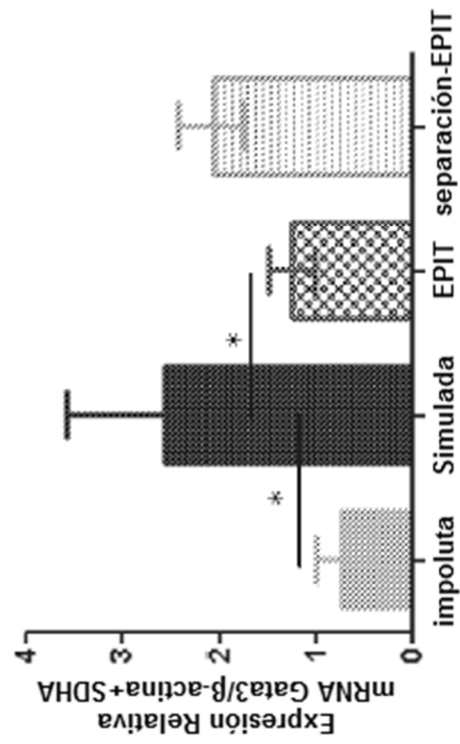


Fig. 10B

Foxp3

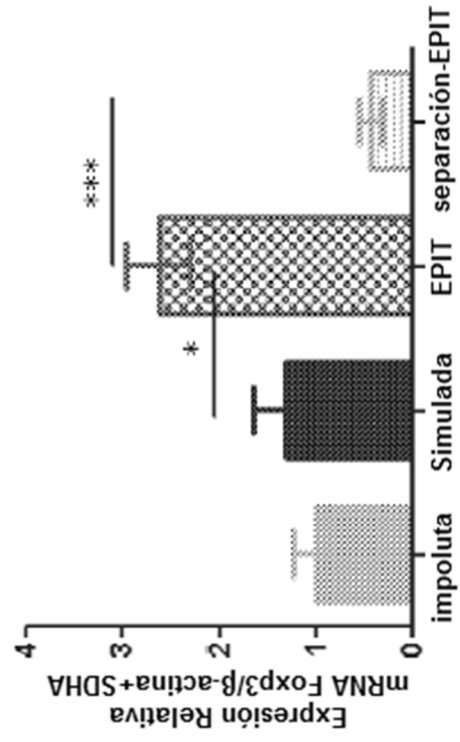


Fig. 11

