

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 156**

51 Int. Cl.:

A61N 5/06 (2006.01)

A61N 5/067 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2012 PCT/US2012/053282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13033496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012 E 12829018 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2758129**

54 Título: **Adyuvantes láser para aumentar la respuesta inmunitaria**

30 Prioridad:

01.09.2011 US 201161530296 P

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

28.08.2017

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)**

**55 Fruit Stret
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**KASHIWAGI, SATOSHI y
POZNANSKY, MARK**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 631 156 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

Adyuvantes láser para aumentar la respuesta inmunitaria

Investigación o desarrollo patrocinado federalmente

5 Esta invención se ha realizado con patrocinio gubernamental según la Subvención N° N66001-10-1-2132 concedida por el Departamento de Defensa. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Campo técnico

Esta divulgación se refiere a métodos para aumentar una respuesta inmunitaria a una vacuna, utilizando coadministración de un láser.

Antecedentes

10 Las vacunas actuales son en general moléculas recombinantes muy específicas, escasamente inmunogénicas, y requieren potenciación con adyuvantes inmunológicos (Harandi AM, Davies G, Olesen OF. (2009) Expert Rev Vaccines 8(3): 293-8; Leroux-Roels G.(2010)Vaccine 28 Suppl 3: C25-36; Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, BramVell VW. (2008) Int J Pharm 364(2): 272-80; Nichol KL. (2008) Vaccine 26 Suppl 4: D17-22; Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. (2009) Trends Immunol 30(1): 23- 32). El desarrollo de adyuvantes
15 inmunológicos seguros y potentes es esencial en la práctica con las vacunas actuales, pero ha resultado frustrante por numerosas razones. A pesar de la proliferación de posibles candidatos a adyuvantes, pocos son los que han demostrado suficiente eficacia y seguridad en su desarrollo. La FDA ha autorizado solo dos adyuvantes inmunológicos durante los últimos 80 años, principalmente debido a la preocupación por los efectos secundarios (Leroux-Roels G. (2010);Reed et al. (2009);Aguilar JC, Rodriguez EG. (2007) Vaccine (19):3752-62; Coffman RL, Sher A, Seder RA. (2010) Immunity 33(4): 492-503). La naturaleza estimulante de las sustancias químicas de los
20 candidatos a adyuvantes convencionales contribuye a su capacidad para sobreactivar la respuesta inmunitaria, dando como resultado efectos secundarios no deseados y toxicidad para el sistema biológico (Leroux-Roels G. (2010); Perrie et al. (2008); Reed et al. (2009); Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. (2009) Lupus 18(13): 1217-25). Además, esta estimulación incontrolable del sistema inmunitario conduce en general a una eficacia limitada. El adyuvante inmunológico más prevalente, las sales del hidróxido de aluminio, provocan escasa respuesta
25 inmunitaria mediada por células y son poco efectivas para determinadas vacunas (Leroux-Roels G. (2010); Reed et al. (2009). Esto constituye un problema común entre los candidatos a adyuvantes potenciales, pero aún no clínicamente aceptables.

30 La piel es la primera línea de defensa contra los patógenos, y la vigilancia por parte del sistema inmunitario de la integridad de esta estructura es esencial para el mantenimiento de la vida (Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. (2009) Nat Rev Immunol 9(10): 679-91; Kaplan DH. (2010) Trends Immunol 31(12): 446-51; Abraham SN, St John AL. (2010) Nat Rev Immunol 10(6): 440-52). Por consiguiente, el sistema inmunitario basado en la piel puede ser potenciado de forma efectiva, y dispuesto a responder a los patógenos mediante la vacunación en esa superficie (Wahl M, Hermodsson S. (1987) Scand J Infect Dis 19(6): 617-21; Vankerckhoven V, Van Damme P. (2010) Expert Opin Drug Deliv 7(9): 1109-25; Sticchi L, Alberti M, Alicino C, Crovari P. (2010) J Prev Med Hyg 51(1): 7-14; Nicolas JF, Guy B. (2008) Expert Rev Vaccines 7(8): 1201-14; Prausnitz MR, Mikszta JA, Cormier M, Andrianov AK. (2009) Curr Top Microbiol Immunol 333: 369-93; Lambert PH, Laurent PE. (2008)Vaccine 26(26): 3197-208). Recientemente se ha evaluado una vía de vacunación intradérmica, y parece resultar más efectiva que la vía
35 intramuscular convencional común a muchas vacunaciones, incluyendo la gripe y la hepatitis B (Vankerckhoven et al. (2010); Nicolas JF, Guy B. (2008);Prausnitz et al. (2009); Lambert et al. (2008);Sangare L, Man hart L, Zehrung D, Wang CC. (2009) Vaccine 27(12): 1777-86). La combinación de una vacunación basada en la piel y un adyuvante puede potencialmente proporcionar la mayor eficacia

Resumen

45 La presente divulgación se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de que longitudes de onda específicas (ej. casi infrarroja, ej. aproximadamente 1064 nm) de luz láser que no dañe los tejidos (ej. menos de 1 V de potencia), aplicada continuamente durante periodos de tiempo cortos (ej. menos de unos 4 minutos, por ej. de 10 segundos a 2 minutos, ej. de 30 a 90 segundos) sobre una pequeña zona de la piel (ej. menos de 0,5 cm), pueden estimular la respuesta inmunitaria a las vacunas. Por tanto, los métodos que se describen aquí incluyen el uso de tales adyuvantes láser en combinación con la administración de vacunas.

50 En un primer aspecto, la divulgación proporciona métodos para aumentar una respuesta inmunitaria protectora a un antígeno (ej. una vacuna) en un sujeto. El método incluye la exposición de la piel del sujeto a una radiación de onda continua con una longitud de onda de 1064 nm; y administrar al sujeto una dosis del antígeno, que es administrado por vía intradérmica, en la piel expuesta a la irradiación o inmediatamente adyacente.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para aumentar la respuesta inmunitaria protectora a un antígeno en un sujeto. Los métodos incluyen la exposición de la piel del sujeto a una radiación de onda continua, con una longitud de onda de aproximadamente 1050 nm a 1080 nm, con una dosis total de radiación casi infrarroja de entre 25 J y 1200 J; y administrar al sujeto una dosis del antígeno, por vía intradérmica, en la piel expuesta a la

irradiación, o la inmediatamente adyacente. En algunas realizaciones, una longitud de onda central de la radiación casi infrarroja es 1064 nm.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para aumentar la respuesta inmunitaria protectora a un antígeno en un sujeto. Los métodos incluyen la exposición de la piel del sujeto a radiación pulsada, a una longitud de onda de entre 1050 nm y 1080 nm, con una dosis total de radiación casi infrarroja de entre 25 J y 1400 J; y administrar al sujeto una dosis del antígeno, por vía intradérmica, en la piel expuesta a la irradiación o en la inmediatamente adyacente. En algunas realizaciones, una longitud de onda central de la radiación casi infrarroja es 1064 nm.

10 En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el antígeno comprende ácido nucleico o proteínas. En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el antígeno es un parásito viral, bacteriano, fúngico, unicelular o multicelular, o una porción del mismo.

15 En algunas realizaciones de los métodos que se describen aquí, el antígeno es un virus de la gripe o una porción del mismo. En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el antígeno es patógeno de polio, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, gripe, tuberculosis (Bacilo Calmette-Guerin (BCG)), sarampión, toxoide tetánico, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre amarilla, difteria-tétanos-tosferina, virus del papiloma humano, vacuna conjugada contra la meningitis multivalente, vacuna antineumocócica conjugada o de la rabia.

En algunas realizaciones de los métodos que se describen aquí, el tiempo total de exposición del sujeto es de entre 10 a 300 segundos, ej. entre 10-90 segundos, ej. 30-60 segundos.

20 En algunas realizaciones de los métodos que se describen aquí, un perfil de intensidad transversal de la radiación tiene básicamente forma parabólica. En algunas realizaciones de los métodos que se describen aquí, la radiación media es de entre aproximadamente 1 V/cm y aproximadamente 5 V/cm. En algunas realizaciones de los métodos que se describen aquí, la radiación media es de aproximadamente 1 V/cm².

En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, la radiación comprende radiación láser, ej. de un láser granate de aluminio e itrio dopado con neodimio (Nd:YAG).

25 En algunas realizaciones de los métodos que se describen aquí, la radiación comprende radiación producida por una fuente no de láser.

30 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado entendido habitualmente por un experto con conocimientos medios en la técnica a la que pertenece esta invención. Se describen aquí métodos y materiales para su uso en la presente divulgación; también pueden utilizarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

La invención viene definida en las reivindicaciones. Otras realizaciones son simplemente a título de ejemplo.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes con la siguiente descripción detallada y las figuras, y con las reivindicaciones.

35 Descripción de los dibujos

Las FIG. 1A-C son un conjunto de tres gráficos e imágenes fotográficas que muestran el efecto del adyuvante láser sobre el tejido cutáneo. Las FIG. 1 A-C (columnas de la izquierda) muestran temperaturas de la superficie cutánea tras iluminación láser de onda continua (CW) o pulsada de nanosegundo (PW) 1064 nm o PW 532 nm, sobre cuatro zonas de la piel afeitada y de pilada de la espalda durante hasta tres min.

40 Las barras de error muestran medias \pm e.e.m.(error estándar de las medias). Las FIG. 1 A-C (columnas de la derecha) son imágenes fotográficas a las 0 y 24 horas tras la iluminación láser cutánea. Cabezas de flecha, daño cutáneo visible, n =1-4 para cada grupo.

45 Las FIG. 2A-B son un conjunto de fotomicrografías que muestran el daño microscópico por el parámetro de no daño tisular del adyuvante láser. Se muestran imágenes representativas del curso temporal de histología cutánea de ratón con iluminación láser de 4 minutos PW 532 nm (200 mV) (FIG. 2A), y de 4 minutos CW 1064 nm (1000 mV) (FIG. 2B). El daño cutáneo fue evaluado a las 0, 6 y 24 horas tras la iluminación láser por histología. Las 3 columnas de la izquierda muestran imágenes de tejido cutáneo teñido TUNEL. Se identificaron en rojo las células apoptóticas. Las columnas más a la derecha muestran imágenes de tejido cutáneo teñido con hematoxilina-eosina. La barra indica 50 μ m. (a-c) n = 2-4 para cada grupo.

50 La FIG. 3 es un gráfico mostrando los títulos IgG específicos de ovoalbúmina (OVA) séricos, a las 3, 6 y 12 semanas tras la vacunación por inyección intradérmica (i.d.) o intramuscular (i.m.) de OVA con o sin iluminación láser o alumbre. Grupos experimentales y control: no vacunación (n = 33), no adyuvante (solo inyección i.d. de OVA, n = 19), alumbre inyectado i.d.(inyección i.d. de OVA y alumbre, n = 15), alumbre inyectado i.m. (inyección i.m. de OVA y alumbre, n = 6), tratados con láser pulsado 1 min (PW) 532 nm (inyección i.d. de OVA y con el tratamiento de láser, n = 12), tratados con láser 4-min PW 532 nm (n = 11), tratados con láser 1 min PW 1064 nm (inyección i.d. de OVA y con el tratamiento de láser, n = 5), tratados con láser 4 min PW 1064 nm, n = 6), tratados con láser 1 min onda continua (CW) 1064 nm (inyección i.d. de OVA y con el tratamiento láser, n = 6), grupos tratados con láser 4-min CW

1064 nm, n = 6). Las barras de error muestran medias \pm e.e.m. *P < 0,05 comparados con los grupos de no adyuvante, ** P < 0,05 tratados con láser PW 532 nm (a tiempo de exposición equivalente).

La FIG. 4 es un conjunto de gráficos mostrando el efecto del adyuvante láser sobre la respuesta inmunitaria humoral a la vacunación. Las FIG. 4a-c los títulos subclase IgG en el estado pre-exposición (4 semanas tras la vacunación).

5 Grupos experimentales y control: no vacunación en estado pre-exposición (a-c: n = 38), no adyuvante (inyección i.d. de vacuna de la gripe, a-c: n = 49), tratados con láser 4 min PW 532 nm (inyección i.d. de vacuna de la gripe con tratamiento de láser, a-c: n = 26), tratados con láser 1min CW 1064 nm (a-c: n = 52), alumbre inyectado i.d. (a-c: n = 12), MPL inyectado i.d. (a-c: n = 12), grupos inyectados i.m. (inyección i.m. de vacuna de la gripe, a-c: n = 24).

La FIG. 5 es un conjunto de gráficos mostrando el efecto del adyuvante láser sobre la respuesta inmunitaria humoral a la vacunación. Las FIG. 5a-c muestran títulos séricos de isotipo IgG específicos de la gripe en estado post-exposición (4 días tras la exposición).

10 Grupos experimentales y control: no vacunación en post-exposición (a-c: n = 25) a, no adyuvante (inyección i.d. de vacuna de la gripe, a-c: n = 31), tratados con láser 4 min PW 532 nm (inyección i.d. de vacuna de la gripe con el tratamiento de láser, a-c: n = 13), tratados con láser 1 min CW 1064 nm (a-c: n = 34), alumbre inyectado i.d. (a-c: n = 12), MPL (monofosforil lípido) inyectado i.d. (a-c: n = 12), grupos inyectados i.m.- (inyección i.m. de vacuna de la gripe, a-c: n = 16), respectivamente.

La FIG. 6 es un gráfico mostrando los títulos HAI (hemaglutinación indirecta) séricos tras la exposición. Grupos experimentales y control: no vacunación (n = 14), no adyuvante (n = 21), tratados con láser PW 532 nm (n = 13), tratados con láser CW 1064 nm (n = 24), alumbre inyectado i.d. (n = 12), MPL inyectado i.d. (n = 12), grupos inyectados i.m. (n = 16) en estado post-exposición.

20 Las FIG. 7A-B son un conjunto de gráficos mostrando el efecto del adyuvante láser en la protección contra la enfermedad. (A) Representaciones gráficas Kaplan-Meier de supervivencia de ratones vacunados con la exposición letal, grupos experimentales y control: no vacunación (n = 16), no adyuvante (n = 20), tratados con láser pulsado 532 nm (n = 20), tratados con láser CW 1064 nm (n = 21), alumbre inyectado i.d. (n = 11), MPL inyectado i.d. (n = 12), grupos inyectados i.m. (n = 11). (B) La dosis infecciosa de huevo 50% (EID50) fue determinada por titulación en serie de homogenado de pulmón en huevos, a los 4 días tras la exposición. Grupos experimentales y control: no vacunación (n = 6), no adyuvante (n = 7), tratados con láser PW 532 nm (n = 6), tratados con láser CW 1064 nm (n = 6), grupos inyectados i.m. (n = 6).

La FIG. 8 es un conjunto de gráficos mostrando el efecto del adyuvante láser en la respuesta inmunitaria sistémica T helper tipo 1 (Th1) antigripe, (a) Las respuestas inmunitarias sistémicas T helper tipo 1 (Th1) tras exposición fueron determinadas en cultivos de 5 h de esplenocitos, tras aislamiento de ratones vacunados y no vacunados 4 días tras la exposición y reestimulación con un péptido nucleoproteína (NP) MHC clase II específico de gripe.

35 Se muestra el porcentaje de células CD4+IFN- γ +, (b) respuestas inmunitarias T helper tipo 2 (Th2). Se muestra el porcentaje de células CD4+IL-5+, (c) respuestas inmunitarias T helper tipo 17 (Th17). Se muestra el porcentaje de células CD4+IL-17+, (d) Se determinó la respuesta inmunitaria sistémica de linfocitos T citotóxicos en cultivo de esplenocitos de 5 h, tras aislamiento de ratones vacunados y no vacunados, tras exposición y reestimulación con un péptido nucleoproteína (NP) MHC clase I específico de gripe. Se muestra el porcentaje de células CD8+IFN- γ +. Grupos experimentales y control; no vacunación (n = 16), no adyuvante (n = 18), tratados con láser PW 532 nm (n = 13), tratados con láser CW 1064 nm (n = 22), alumbre inyectado i.d. (n = 10), MPL inyectado i.d. (n = 12), grupos inyectados i.m. (n = 13) en estado post-exposición. Las barras de error muestran medias \pm e.e.m.

40 La FIG. 9 es un gráfico mostrando los títulos séricos IgE específicos de gripe en estado post-exposición. Grupos experimentales y control: no vacunación (n = 8), no adyuvante (inyección i.d. de vacuna de la gripe, n = 8), tratados con láser 1 min CW 1064 nm (inyección i.d. de vacuna de la gripe con el tratamiento de láser, n = 11), alumbre inyectado i.d. (n = 12), MPL inyectado i.d. (n = 12), grupos inyectados i.m. (inyección i.m. de vacuna de la gripe, n = 8), respectivamente.

45 Descripción detallada

La capacidad del tratamiento de la piel con luz láser visible no dañina para aumentar las respuestas inmunitarias a la vacunación intradérmica ha sido descrita recientemente en la literatura (Onikienko SB, Zemlyanoy AB, Margulis BA, Guzhova IV, Varlashova MB, Gornostaev VS, Tikhonova NV, Baranov GA, Lesnichiy VV. (2007) *Donosologiya* (San Petersburgo) 2007; 1:32-54; Chen X, Kim P, Farinelli B, Doukas A, Yun SH, Gelfand JA, Anderson RR, Wu MX. (2010) *PLoS One* 5(10): e13776; WO 2009/044272). La iluminación láser produjo un aumento significativo de la vacunación modelo concomitante en ratones (Chen X, Kim P, Farinelli B, Doukas A, Yun SH, Gelfand JA, Anderson RR, Wu MX. (2010) *PLoS One* 5(10): e13776; WO 2009/044272). Se ha informado también de que el mismo parámetro de láser, aplicado al punto de vacunación, ha mejorado la respuesta a la vacunación de la gripe, en pacientes sin respuesta a una vacuna de la gripe profiláctica sin aplicación de láser (Onikienko et al. (2007)). Tales tratamientos con láser parecen alterar la respuesta de las células cutáneas presentadoras de antígeno, lo que resulta en un aumento de la respuesta serológica a la vacunación en ratones, así como la mejora observada en la respuesta inmunitaria a la vacuna de la gripe de pacientes sin respuesta (Onikienko et al. (2007); Chen et al. (2010)).

Los presentes inventores han seguido desarrollando este enfoque, y han demostrado que la iluminación continua de un punto de vacunación en la piel con un láser de potencia relativamente baja (ej. menos de aproximadamente 1 vatio) casi infrarrojo (ej. aproximadamente 1064 nm) de onda continua (CW) aumentaba la producción de

anticuerpos a la vacunación en mayor medida que otros enfoques con láser; la iluminación con un láser de 1064nm CW produjo un incremento 27 veces mayor ($27,2 \pm 11,4$) en la producción de anticuerpos a una vacuna de laboratorio (OVA a las 6 semanas) (esto puede compararse con un aumento de 8 veces ($7,9 \pm 27$) provocado por un láser visible de 532 nm).

5 Como se demuestra aquí, en un estudio de exposición a la gripe (tamaño de grupo experimental y control = 5-10) se observó que con un minuto de tratamiento con láser infrarrojo antes de la vacunación de la gripe intradérmica se reducía la dosis de vacuna necesaria para proporcionar protección contra una exposición letal a la gripe (solo se observó protección en el grupo de vacuna intradérmica $1\mu\text{g}$ + láser y el grupo de solo $10\mu\text{g}$ de vacuna intramuscular comparado con no protección en los grupos de solo $1\mu\text{g}$ de vacuna intradérmica y sin vacuna).

10 Los datos que se presentan aquí indican además que a esas dosis la iluminación no dañó el tejido. Esto contrasta con métodos anteriores que (en algunos casos) provocaban expresamente daño tisular, en un intento por aumentar la absorción (ej. como se describe en US2003/0078499, US2001/0050083, y US 2004/0236268).

Absorción de energía dependiente de la longitud de onda de la luz en el tejido cutáneo

15 Como se describe aquí, un láser casi infrarrojo de 1064 nm puede potenciar una vacuna de laboratorio en ratones de forma mucho más eficiente comparada con luz láser de 532 nm. Los mecanismos concretos y las moléculas responsables del efecto adyuvante y la vía de señalización para la estimulación inmunitaria siguen siendo elusivos. Los procesos fotobiológicos, incluyendo la visión en animales y la fotosíntesis en las plantas, utilizan principalmente longitudes de onda que van de ultravioleta (UV, 300 nm) a casi infrarrojo (NIR, 900 nm), y las moléculas responsables de esas fotorrepciones han sido bien estudiadas y caracterizadas durante décadas. De forma similar, los fotones del láser deben ser absorbidos por algunas moléculas para tener efectos biológicos.

20 Un cromóforo es una molécula que imparte algún color decidido al compuesto del que es ingrediente, y gobierna mecanismos de interacciones láser-tejido (Huang et al. (2009)). En la piel hay numerosos cromóforos posiblemente relacionados con el adyuvante láser. Es decir, cofactores tales como la flavina, el heme y los iones metálicos, representan típicamente la absorción en la región de longitud de onda azul del espectro visible; por ejemplo, la hemoglobina, la citocromooxidasa, los citocromos, las flavinas, las flavoproteínas y las porfirinas contienen esas fracciones. Esos cromóforos se presentan en la piel generalmente en una de dos formas: sistemas conjugados de electrones pi y complejos metálicos, dando como resultado la absorción de un determinado espectro de luz (típicamente unos 450 nm) (Karu TI. (2008) Photochem Photobiol 84(5): 1091-9; Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. (2009) Dose Response 7(4): 358-83; Karu T. (1999) J Photochem Photobiol B 49(1): 1-17; Niemz MH. (2007) Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering) 308). Otra clase de cromóforos cutáneos dominantes es la melanina, que presenta una amplia absorción de la luz que va de 400 a 700 nm. Absorbe eficientemente la radiación ultravioleta y transforma la energía en calor para proteger el ADN en las células cutáneas (Meredith P, Riesz J. (2004) Photochem Photobiol 79(2): 211-6). Finalmente, un componente omnipresente del sistema biológico, el agua, es también un cromóforo. El coeficiente de absorción, una medida que muestra la fracción de energía absorbida de un haz de luz, del agua pura, oscila de 0,03 a $0,06\text{ cm}^{-1}$ entre 760 - 1000 nm, y menos de $0,01\text{ cm}^{-1}$ a $< 700\text{ nm}$ de haz de luz, indicando que el contenido casi infrarrojo e infrarrojo es fuertemente absorbido por el agua (Boulnois J. (1986) Lasers Med Sci 1(1): 47-66; Niemz MH. Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering) 308). Resumiendo, la absorción de la luz en el tejido cutáneo viene determinada por los cromóforos, y por consiguiente depende de la longitud de onda de la luz que llega.

Las células dendríticas de la piel son un objetivo para la luz láser

45 Las células dendríticas (DCs) son las células presentadoras de antígenos (APCs) más potentes y versátiles y tienen un papel fundamental en la inmunidad adaptativa (Lanzavecchia A, Sallusto F. (2001) Curr Opin Immunol 13(3): 291-8; Trombetta ES, Mellman I. (2005) Annu Rev Immunol 23: 975-1028; Mellman I, Steinman RM. (2001) Cell 106(3):255-8). Las DCs muestran una considerable heterogeneidad en su localización anatómica, su fenotipo de superficie y sus propiedades funcionales, pero las poblaciones de células dendríticas residentes en la piel, es decir células de Langerhans y células dendríticas dérmicas, se posicionan en la piel y funcionan como centinelas inmunitarias. Las DCs residen en la piel, e incluyen células de Langerhans (LCs) y DCs dérmicas, que son las APCs más potentes en el sistema inmunitario (Nestle et al. (2009); Lanzavecchia A, Sallusto F. (2001) Curr Opin Immunol 13(3): 291-8; Trombetta ES, Mellman I. (2005) Annu Rev Immunol 23: 975-1028; Ruedl C, Koebel P, Bachmann M, Hess M, Karjalainen K. (2000) J Immunol 165(9): 4910-6). Cuando encuentran un antígeno extraño, emigran rápidamente a órganos linfoides secundarios, en especial nódulos linfáticos de drenaje de la piel (skin-DLNs), para estimular a los linfocitos T naive o de memoria central, y provocar unas respuestas inmunológicas potentes y duraderas (Randolph GJ, Inaba K, Robbani DF, Steinman RM, Muller WA. (1999) Immunity 11(6): 753-61). Cabe destacar que se ha considerado que la mayoría de los actuales adyuvantes de vacunas y potenciales candidatos interactúan con las DCs en el punto de inyección de la vacuna, y colaboran en la absorción del antígeno y la migración de DLNs. Esto provoca un aumento de la presentación de antígenos a los linfocitos T y una respuesta inmunitaria de larga duración (Leroux-Roels G. (2010); Reed et al. (2009); Palucka K, Banchereau J, Mellman I. (2010) Immunity 33(4): 464-78). Es interesante observar que se ha demostrado que la luz láser de baja potencia indujo la maduración de DC cultivadas in vitro (Chen AC-H, Huang YY, Sharma SK, Hamblin MR. (2010) SPIE: 756504-7), y que un láser visible de potencia moderada aumentaba la migración de DC en la piel, dando como

resultado un incremento de la producción de anticuerpos en ratones (Chen X, Kim P, Farinelli B, Doukas A, Yun SH, Gelfand JA, Anderson RR, Wu MX. (2010). Un nuevo adyuvante láser de vacuna aumenta la motilidad de las células presentadoras de antígeno. PLoS ONE 5(10): e13776). Por tanto, sin querer estar limitados por la teoría, se postula que las DCs cutáneas son importantes objetivos para el láser adyuvante.

5 *Vacunas y administración de vacunas*

Los métodos que se describen aquí pueden ser utilizados con cualquier tipo de vacuna, contra un patógeno causante de enfermedad, incluyendo, entre otros, antígenos bacterianos, virales y parasitarios. Entre los ejemplos de vacunas se incluyen las vacunas de patógenos muertos contra la gripe, el cólera, la peste bubónica, la polio, la hepatitis A y la rabia; las vacunas atenuadas, ej. contra la fiebre amarilla, el sarampión, la rubeola, las paperas, la viruela, el tifus y la tuberculosis micobacteriana; las vacunas toxoides, ej. contra el tétanos, la difteria (incluyendo la toxoide para las picaduras de la serpiente de cascabel); las vacunas subunit, ej. contra el virus de la hepatitis B, la vacuna de partículas similares al virus (VLP) contra el virus del papiloma humano (HPV), y la peste; y vacunas conjugadas, ej. la vacuna de *Haemophilus influenzae* tipo B. En algunas realizaciones, las vacunas pueden incluir cualquier antígeno, ej. antígeno de ácido nucleico (ej. ARN o ADN) o proteína (ej. polipéptido o péptido), y pueden ser intactas o desnaturalizadas.

En los métodos que se describen aquí, la vacuna es administrada tras el tratamiento con láser, ej. en los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 30, 60, o 90 minutos siguientes al tratamiento con láser. De preferencia, la vacuna se administra inmediatamente después del tratamiento con láser, ej. en los 5 minutos siguientes.

La vacuna se administra intradérmica, en la piel que ha sido expuesta al tratamiento con láser o la inmediatamente adyacente. Las capas superiores de la piel contienen cantidades importantes de células dendríticas, lo que hace que esos tejidos sean los objetivos preferibles para la potenciación por láser de la vacunación. La vacunación intradérmica ha sido utilizada con éxito en las campañas de vacunación nacionales, incluyendo en Dinamarca, y ha demostrado producir una seroconversión equivalente en dos ensayos clínicos (Nirmal S, Cherian T, Samuel BU, Rajasingh J, Raghupathy P, John TJ. Vaccine 1998; 16(9):928-31; Mohammed AJ, AlAwaidy S, Bawikar S, Kurup PJ, Elamir E, Shaban MM, Sharif SM, van der Avoort HG, Pallansch MA, Malankar P, Burton A, Sreevatsava M, Sutter RW. N Engl J Med 2010;362(25):2351-9).

Adyuvantes láser

En algunas realizaciones, los métodos descritos aquí incluyen el uso de irradiación básicamente no lesiva sin dolor o evidencia visible de inflamación (ej. menos de aproximadamente 1 W) de una pequeña zona (ej. menos de 0,5 cm) de la piel (ej. con luz láser), generalmente aplicada inmediatamente antes de la vacunación en la misma zona de la piel. Un experto en la técnica apreciará que los parámetros de la radiación aplicada pueden variar sin dejar de garantizar que la irradiación (1) no produce un daño sustancial en la piel, y (2) aumenta efectivamente la respuesta inmunitaria de un paciente. De preferencia, la dosis aplicada no es dolorosa.

En los presentes métodos, la radiación aplicada es de onda continua (CW) o pulsada correspondiendo sustancialmente a una longitud de onda óptica única. La longitud de onda central de la radiación aplicada (ej. la longitud de onda a la que la radiación aplicada es más intensa) se selecciona generalmente para producir una variación deseada en la respuesta inmunitaria de un paciente. En algunas realizaciones, la longitud de onda central es de aprox.1000-1200 nm, ej. aproximadamente 1040-1090, o 1050-1080 nm, o aprox.1060-1070 nm, ej. aproximadamente 1064 (ej. más o menos aprox. 5, 10, 15, 20, o 25 nm, ej. 1064 +/- 15 nm). En algunas realizaciones, el límite inferior del posible rango de longitud de onda central de la radiación aplicada es de 1064 nm o menos (ej. 1050 nm o menos, 1000 nm o menos, 950 nm o menos, 900 nm o menos, pero por lo menos 850 nm). En determinadas realizaciones, el límite superior del rango posible de la longitud de onda central de la radiación aplicada es más de 1064 nm (ej. 1100 nm o más, 1150 nm o más, pero no más de 1200 nm).

En los métodos que se describen aquí, la dosis total de irradiación administrada al paciente es de 25 J/cm² o más (ej. 50 J/cm² o más, 75 J/cm² o más, 100 J/cm² o más, 200 J/cm² o más, 300 J/cm² o más, 400 J/cm² o más, 500 J/cm² o más, 600 J/cm² o más), hasta aproximadamente 1400 J/cm² o menos (ej. 1200 J/cm² o menos, 1000 J/cm², 800 J/cm² o menos).

En algunas realizaciones, la potencia media, el tamaño del haz y el tiempo de exposición pueden seleccionarse para administrar una dosis total de radiación determinada a un paciente, para mediar la respuesta inmunitaria del paciente a uno o más antígenos, evitando al mismo tiempo provocar daños importantes en la piel. Se pueden utilizar múltiples combinaciones de potencia media, tamaño de haz, y tiempo de exposición para administrar la misma dosis total de irradiación, y esos parámetros pueden variar para alcanzar otros objetivos, tales como tiempos de tratamiento deseados, reducciones de los efectos secundarios fisiológicos de la radiación aplicada (ej. apoptosis), y el grado de control sobre el límite entre tejido expuesto y no expuesto.

En algunas realizaciones, la energía láser se puede administrar en una serie de pulsos donde la frecuencia del pulso optimiza el calentamiento de la piel. Dado que el tiempo de relajación térmica de la piel es de 700 (µsec a 1 msec) y el tiempo de relajación efectivo es unas 40 veces superior al tiempo de relajación de un solo pulso (Choi B, Welch AJ. Analysis of thermal relaxation during laser irradiation of tissue. Lasers Surg Med 2001;29(4):351-9), el perfil térmico en la piel puede ser optimizado cuando los pulsos son administrados a un máximo de cada 30-40 msec y la

duración de los pulsos individuales es igual o inferior a esto. En un aspecto, el láser puede operar en duraciones de pulsos de 30-40 mseg en un ciclo de servicio del 50%.

5 En otra realización, las duraciones de los pulsos individuales pueden ser significativamente más cortas que 30-40 mseg con el fin de controlar la difusión del calor y optimizar la administración de la dosis, es decir, igual o por debajo del tiempo de relajación térmica de 700-1000 (μ sec). Al mismo tiempo, tales pulsos tendrán una duración significativamente superior que aquellos que pueden causar efectos fotoacústicos o fototérmicos intensos, es decir, por encima de 1 μ seg. En los métodos descritos aquí, las duraciones de los pulsos pueden ser 1-1000 μ sec con por lo menos 30-40 mseg entre pulsos.

10 Los expertos en la técnica están familiarizados con las estrategias de combinar duraciones de pulsos y repetición de pulsos en formas que optimicen la administración de energía láser en la piel minimizando al tiempo la posibilidad de provocar daños o molestias. Tal combinación de las duraciones de pulsos y frecuencias de pulso se utilizarán de una forma que acorte el tiempo requerido para administrar una dosis efectiva de luz (es decir, 25-1400 J/cm²) en el periodo de tiempo más corto posible manteniendo al mismo tiempo la piel expuesta a una temperatura por debajo del umbral de dolor típico (es decir, unos 42-43°C).

15 Como un experto en la técnica apreciará, el tiempo de exposición total de la piel a la radiación aplicada puede seleccionarse para garantizar que una dosis clínicamente efectiva de radiación sea administrada, mientras que al mismo tiempo se asegure que se no produce un daño significativo en la piel. Por ejemplo, el tiempo de exposición total puede ser de 10 segundos o más (por ej. 30 segundos o más, 60 segundos o más, 120 segundos o más, 180 segundos o más, 240 segundos o más), con un límite máximo de aprox. 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, o 4 minutos.
20 Son preferentes exposiciones más breves, por ej. 10-60 segundos.

La potencia media de la radiación aplicada también puede seleccionarse para garantizar que se administre una dosis clínicamente efectiva sin apoptosis significativa. En algunas realizaciones, la potencia media de la radiación aplicada es de 0,5 V o más (por ej. 0,8 V o más, 1,0 V o más) y/o 5,0 V o menos (por ej. 4,0 V o menos, 2,0 V o menos).

25 La radiación aplicada se administra típicamente en un haz con un área trans-seccional de 0,5 cm² o menos (por ej. 0,3 cm² o menos, por ej. aprox. 0,2 cm², o aprox. 0,1 cm²) de forma que la densidad de potencia de la radiación aplicada (radiación) sea de 1,0 V/cm² o más (por ej. 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 V/cm² o más), con un límite máximo de 25 V/cm² o menos (por ej. 20 V/cm² o menos, 10 V/cm² o menos). En algunas realizaciones, la radiación media es aprox. 1-7 V/cm², por ej. aprox. 1-5 V/cm², por ej. aprox. 2-6 V/cm², por ej. aprox. 5 V/cm².

30 En algunas realizaciones, el perfil de intensidad trans-seccional del haz de radiación aplicado se puede ajustar, por ejemplo, para asegurar que las células expuestas reciban dosis similares de radiación. En determinadas realizaciones, por ejemplo, el perfil de intensidad trans-seccional del haz aplicado puede ser sustancialmente en forma parabólica. Usando un haz parabólico de radiación se puede reducir simultáneamente la sobreexposición de determinadas células (por ej. cerca del centro del haz) y la infra-exposición de otras células (por ej. cerca de los
35 bordes del haz) que puede ocurrir con otras formas de haz (por ej. algunos haces Gaussian). Para garantizar que las células expuestas reciban dosis similares de radiación aplicada, el perfil de intensidad trans-seccional del haz aplicado se puede ajustar más de forma que las variaciones en la intensidad a lo largo del diámetro del haz se reduzcan aún más. Por ejemplo, el perfil de intensidad trans-seccional del haz puede ser ajustado (por ej. usando elementos ópticos de filtrado espacial) para coincidir, lo más exactamente posible, a un perfil cuadrado o 'plano'.

40 Se pueden usar diferentes dispositivos para administrar la radiación aplicada a un paciente.

Esta divulgación, a efectos de claridad y brevedad, describe el uso de diferentes fuentes de láser para administrar radiación. Por ejemplo, existen sistemas láser portátiles de bajo coste que administran potencias apropiadas para mejorar la respuesta a las vacunas. La exposición basada en láser también se puede combinar con tecnologías de vacunas intradérmicas de inyección con microaguja o inyector para aumentar la uniformidad de la vacunación intradérmica e identificar el impacto del tratamiento láser en la reducción de la dosis de antígenos en estos sistemas.
45

Se pueden usar distintas fuentes de láser para producir radiación a los fines de esta divulgación. En algunas realizaciones, por ejemplo, se pueden usar láseres basados en Nd (por ej. láseres Nd:YAG y/o Nd:YVO4) para producir radiación. En determinadas realizaciones, se pueden usar láseres semiconductores (por ej. láseres basados en materiales semiconductores por capas incluyendo múltiples láseres *quantum well*) para producir radiación. Pueden seleccionarse láseres semiconductores, a través de la elección sensata de materiales, para producir radiación láser en una o más longitudes de onda deseadas.
50

Aunque estas tecnologías láser clínicamente seguras y bien reconocidas se han empleado en diversas aplicaciones médicas como láser in situ en queratomielosis (LASIK), lipólisis, depilación, y terapia fotodinámica (PDT) durante décadas (ver por ej. Aronoff BL. (1997) J Surg Oncol 64(1):84-92; Krauss JM, Puliafito CA. (1995) Lasers Surg Med 17(2):102-59; Houk LD, Humphreys T. (2007) Clin Dermatol 25(5):434-42.; Niemz MH. (2007) Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering) p.308), su uso como adyuvante inmunológico no ha sido explorado hasta ahora. Los láseres infrarrojos pueden ser fácilmente integrados en un dispositivo adecuado para el desarrollo comercial de forma bastante sencilla.
55

Otros tipos de fuentes también se pueden utilizar para producir la radiación adecuada. En particular, la radiación que se administra a un paciente no necesita ser una radiación uniforme. Por tanto, otras fuentes, incluyendo fuentes de LED, fuentes láser de diodo, fuentes fluorescentes, fuentes incandescentes, y fuentes de descarga, pueden producir radiación adecuada para mediar la inmunidad. En algunas realizaciones, la longitud de onda central de la radiación producida por estas fuentes se puede ajustar como se desee. Por ejemplo, la emisión de las longitudes de onda de las fuentes de LED y de las fuentes de láser de diodo se puede controlar eligiendo los materiales usados en la fabricación de las fuentes. Además, múltiples elementos de fuentes diferentes (por ej. múltiples LEDs, múltiples diodos láser) se pueden combinar para producir fuentes de banda ancha que se pueden filtrar selectivamente según se desee para producir radiación en una longitud de onda central particular para administrar a un paciente. De forma similar, las fuentes incandescentes de banda ancha, fluorescentes, y de descarga pueden ser filtradas para producir radiación en una longitud de onda central particular usando diversos elementos de filtrado óptico perfectamente reconocidos.

EJEMPLOS

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Salvo que se indique otra cosa a continuación, se usaron los siguientes métodos en los siguientes ejemplos.

Animales. Se adquirieron ratones hembra C57BL/6J de siete semanas en Jackson Laboratory. Todos los ratones se mantuvieron en instalaciones barrera específicas libres de patógenos. Todas las mediciones se realizaron de forma ciega, (para grupos de control o experimentales), y todos los procedimientos se realizaron siguiendo la Política del servicio de salud pública sobre el cuidado humano de animales de laboratorio y aprobada por el Comité institucional de uso y cuidado animal del Hospital General de Massachusetts.

Láseres. Los láseres usados en estos experimentos fueron láser de ortovanadato de itrio dopado con neodimio en estado sólido activado por diodo conmutado-Q (Nd:YVO₄) que emite luz a 532 nm (UP6G, RMI Laser LLC, Lafayette, CO); un láser Nd:YVO₄ emitiendo luz a 1064 nm (UP10G, RMI Laser LLC, Lafayette, CO); o un láser de fosforo de indio que emite luz a 1470 nm (SemiNex Laser Co, Peabody, MA). Los parámetros de los láseres se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de los láseres

Parámetros láseres	Pulso verde Pulse	Pulso NIR*	NIR* CW	Pulso MIR**
Tipo de láser	Láser Nd:YVO ₄ (Láser UP6G, RMI)	Láser Nd:YVO ₄ (Láser UP10G, RMI)	Láser Nd:YVO ₄ (Láser UP10G, RMI)	Fosforo de indio (Láser SemiNex)
Longitud de onda	532 nm	1064 nm	1064 nm	1470 nm
Potencia media	0,2V	1,0V	1,0V	1,0V
Tamaño del haz	5 mm (circular)	5 mm (circular)	5 mm (circular)	5 mm (cuadrado)
Área del haz	0,2 cm ²	0,2 cm ²	0,2 cm ²	0,25 cm ²
Perfil del haz	Parabólico+	Parabólico+	Parabólico+	Plano
Densidad de potencia	1,0 V/cm ²	5,0 V/cm ²	5,0 V/cm ²	4,0 V/cm ²
Duración de pulso	10 nseg	10 nseg	N.A.	5 o 15 mseg
Frecuencia	10 kHz	10 kHz	CW	6 r 20 Hz
Tiempos exposición (seg)	60, 120, 240	60, 120, 240	60, 120, 240	300
Dosis (J/cm ²)	60, 120, 240	300, 600, 1200	300, 600, 1200	120

*NIR: infrarrojo cercano **MIR: infrarrojo medio

+El haz parabólico es 50-100% más intenso en el centro que en el borde

Como muestra la Tabla 1, estos láseres producen pulsos láser con duración de 10 nanosegundos (ns) - 15 milisegundos (ms) con una periodicidad de 1-10 kHz. La potencia media es de 200 - 1000 mV. El área de exposición sobre la piel es aprox. de 0,2 cm². Los tiempos de exposición para el ratón fueron de unos 1-4 minutos. Durante la exposición al láser, la temperatura de la piel superficial fue controlada con un termómetro infrarrojo o un captador de imágenes térmicas para supervisar el daño en la piel relacionado con el calor.

Iluminación láser. Los experimentos fueron realizados usando un láser de ortovanadato de itrio dopado con neodimio (Nd:YVO₄) que emitía luz a 1064 o 532 nm. A 1064 nm, el láser produce ya sea en onda continua (CW) o corta, pulsos de láser de una duración de nanosegundos (PW) con una periodicidad de 10 kHz, mientras que a 532 nm produce solo PW. La potencia de salida media se determinó mediante un medidor de potencia para cada iluminación (S302C, Thorlabs). El perfil del haz fue conformado para que fuera relativamente plano, con menos de

un 50% de variación en la intensidad del haz desde el centro hasta el borde. El tamaño del punto de láser en la piel era de aprox. 5 mm, resultando un área expuesta de aprox. 0,2 cm. Una semana después de la importación, se retiró el pelo del ratón de la iluminación/vacunación. Se anestesiaron los ratones mediante inyección intramuscular con un cóctel de 90 mg de quetamina (Parke-Davis) y 9 mg de xilacina (Fermenta) por kg de peso corporal. Se rasuraron los lomos de los ratones y se retiró el pelo restante usando un depilatorio habitual del comercio (Nair, Church & Dwight Co.). Al día siguiente, se anestesiaron los ratones, se colocaron en una platina y se iluminó la piel rasurada con el láser. La piel del lomo fue dividida en cuatro áreas en cada ratón. Se utilizó un punto de inyección para la vacuna de la gripe. La temperatura de la piel fue controlada y medida durante el proceso usando un captador de imágenes térmicas por infrarrojos (FLIR Systems). El campo iluminado sobre la piel fue demarcado con un marcador permanente inmediatamente después de cada iluminación láser para asegurar una inyección reproducible de la solución de la vacuna en cada punto iluminado.

Estudio de daños en la piel mediante inspección visual e histología. Para determinar una dosis no dañina en el tejido de cada parámetro láser, la piel tratada con láser se evaluó en una forma dependiente del tiempo mediante inspección visual e histología. Los ratones recibieron iluminación láser CW o PW 1064 nm o PW 532nm en la piel del lomo durante tres minutos. La temperatura de la piel superficial fue controlada con un captador de imágenes térmicas por infrarrojos (FLIR Systems). Se evaluaron los daños en la piel a los 0, 1,2, y 4 días después de la iluminación mediante inspección visual e histología. Se consideró que las radiaciones máximas seguras eran aquellas en las que la temperatura de la piel no superó los 42° C durante la exposición y para las cuales no se observaron daños aparentes visibles o microscópicos en la piel en ningún momento de la evaluación post-exposición. En cuanto a la histología de la piel, los ratones fueron fijados por perfusión con un 4% (p/v) de paraformaldehído a las (antes de la iluminación láser), 3, 6, 24, 48, y 96 horas después de la iluminación láser. La piel iluminada fue extirpada e introducida en parafina. Las secciones (5 µm de espesor) fueron teñidas con H & E y examinadas por el Dr. Roderick Bronson de la Harvard Medical School para buscar daños tisulares microscópicos y respuestas inflamatorias.

Tinción de TUNEL. Se realizó una tinción de TUNEL sobre secciones de piel de 5 µm de espesor preparadas según se ha descrito en la sección anterior usando el Kit In situ Cell Death Detection TMR Rojo (Roche Applied Science). Se visualizaron los portaobjetos con microscopia confocal (Carl Zeiss LSM5 Pascal, Carl Zeiss Norteamérica).

Administración de ovoalbúmina. Se administró a los ratones una inyección intradérmica de ovoalbúmina purificada cromatográficamente (OVA, 10 µg en 10 µl de solución salina, 4 puntos, 40 µg en total, Worthington Biochemicals), que se determinó que contenía menos de 1,75 EUmg⁻¹ de endotoxina usando un kit de ensayo de lisado de amebocito limulus (Cambrex Bio Science). Los ratones de control recibieron una inyección intradérmica de OVA sola sin iluminación láser precedente. Los ratones de control no vacunados se trataron simultáneamente pero no recibieron inyección de OVA ni iluminación láser. El adyuvante estándar, alumbre (Imject® Alum, Thermo-Fisher) se usó como control positivo. Las muestras de sangre y suero fueron extraídas de los ratones a las 3, 6 y 12 semanas post-vacunación para la evaluación de la inmunidad humoral frente a OVA. Se recogieron las muestras vía sangrado retro-orbital bajo anestesia con quetamina y xilacina. Se sometió a los animales de control a un procedimiento simulado en el cual fueron anestesiados y rasurados como antes, pero sin aplicar láser.

Administración del virus de la gripe. Los ratones recibieron una dosis de láser en un solo punto de vacunación y fueron después inyectados intradérmicamente con 1 µg del virus de la gripe inactivado completo A/PR/8/34 (H1N1) (1 µg en 10 µl de solución salina, Charles River Avian Vaccine Services) con o sin 10 µg de lípido monofosforil A (VacciGrade™, un preparado de grado preclínico de MPL, InvivoGen) o alumbre (Imject® Alum, preparado de forma que el ratio de volumen final de Imject Alum para inmunogenicidad es 1:1, Thermo-Fisher). Los controles negativos y positivos incluyeron la inyección del vehículo de la vacuna y la vacunación intradérmica o intramuscular con una dosis de 1 µg, respectivamente. Las muestras de sangre se extrajeron a las 4 semanas post-vacunación o a los 4 días post-exposición con aplicación intranasal del virus de la gripe 4 semanas después de la vacunación para determinar la producción de anticuerpos específicos del virus de la gripe.

Ensayos ELISA para la cuantificación de anticuerpos anti-OVA y anti-virus de la gripe. Se cubrieron durante la noche 2 placas de fondo plano HB Immulon™ (Thermo-Fisher) con 1 µg de OVA a una concentración de 5 µgml⁻¹ o 0,2 µg del virus de la gripe inactivado a 1 µgml⁻¹. Las muestras séricas de ratón diluidas serialmente se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 1 hora en las placas cubiertas y cerradas. Las inmunoglobulinas unidas fueron detectadas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante apropiado (anticuerpo de cabra a IgG de ratón [1:10,000, Sigma-Aldrich]; anticuerpo de rata a IgG1 de ratón [1:4,000, SouthernBiotech]; anticuerpo de rata a IgG2b de ratón [1:500, SouthernBiotech]; anticuerpo de cabra a IgG2c de ratón [1:4,000, SouthernBiotech]; anticuerpo de cabra a IgA de ratón [1:1,000, Sigma-Aldrich]). Al final de la primera hora de incubación, se añadió el sustrato TMB (Thermo Scientific Pierce 1-Step Ultra TMB, Thermo-Fisher) y se paró la reacción con ácido sulfúrico 2 N.

La reproducibilidad del ensayo de determinó mediante la aplicación de IgG anti-ovoalbúmina de ratón (Sigma-Aldrich) o suero de ratón hiperinmune al virus de la gripe en cada placa, medimos la absorción a 450 nm usando un lector ELISA (lector de placas TECAN Sunrise™, TECAN). Para títulos de anticuerpos a OVA, se determinó un título de anticuerpos de punto final definido estadísticamente tal como se ha descrito previamente. Para títulos de anticuerpos para el virus de la gripe, se designó un título como dilución sérica correspondiendo a una mitad de la actividad máxima.

Ensayo ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgEs anti-virus de la gripe. Se cubrieron durante la noche 2 placas de fondo plano HB Immulon™ (Thermo-Fisher) con 2 µg del virus de la gripe inactivado en 10 µgml⁻¹. Las muestras de suero de ratón diluidas serialmente se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 1 hora en las placas cubiertas y cerradas. Se detectaron inmunoglobulinas unidas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante apropiado (anticuerpo de rata a IgE de ratón [1:1,000, SouthernBiotech] seguido por el uso de un Sistema de amplificación ELAST ELISA (Perkin Elmer). Después se añadió el sustrato TMB (Thermo Scientific Pierce 1-Step Ultra TMB, Thermo-Fisher) y se paró la reacción con 2 N de ácido sulfúrico. La reproducibilidad del ensayo fue evaluada mediante la aplicación de un suero de ratón inmunizado con virus de la gripe inactivado con adyuvante de alumbre en cada placa, medimos la absorción a 450 nm usando un lector ELISA (lector de placas TECAN Sunrise™, TECAN). Para los títulos de anticuerpos para el virus de la gripe, se determinó un título de anticuerpos de punto final definido estadísticamente tal como se ha descrito previamente (Frey, A., et al., A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* 221,35-41 (1998).

Titulación de la inhibición por hemoaglutinación (HAI) para cuantificar los anticuerpos neutralizantes anti-virus de la gripe. Se analizaron sueros de ratón para un título HAI por Charles River Avian Vaccine Services como se ha descrito previamente (Matsuoka, Y., et al., *Curr Protoc Microbiol* Chapter 15, Unit 15G 13 (2009); Szretter, K.J., et al., *Curr Protoc Microbiol* Chapter 15, Unit 15G 11 (2006)). Todos los ensayos fueron realizados de forma ciega para el operador.

Estudio de la exposición al virus de la gripe. El virus de la gripe A A/PR/8/34 (H1N1) usado en este estudio fue adquirido en Charles River Avian Vaccine Services. Se anestesiaron los ratones con quetamina/xilacina, y se expusieron intranasalmente con A/PR/8/34 a una dosis infecciosa de huevo 50% (EID₅₀) de 1,5 x 10⁶ que equivale a 3 x 10³ (MLD₅₀) 50% de dosis letal de ratón en 30 µl de solución salina. Se monitorizó la supervivencia y el peso corporal durante los días posteriores a la exposición. Se consideró que los ratones que mostraban una postura encorvada, pelaje rugoso, una pérdida de peso corporal superior al 20%, o que no habían comido o bebido habían alcanzado el punto final experimental y fueron sometidos a eutanasia. Los títulos MLD₅₀ fueron determinados por la inoculación de los grupos de ratones intranasalmente con diluciones en serie del virus usando la fórmula Reed-Muench como se ha descrito anteriormente (Matsuoka, Y., et al., *Curr Protoc Microbiol* Chapter 15, Unit 15G 13 (2009); Szretter, K.J., et al., *Curr Protoc Microbiol* Chapter 15, Unit 15G 11 (2006)).

Titulación del virus en homogenado pulmonar.

Cuatro semanas después de la inmunización inicial, los ratones fueron sometidos a A/PR/8/34 como se ha descrito anteriormente. Cuatro días después de la exposición, los ratones se sometieron a eutanasia con dióxido de carbono, y se aislaron y pesaron los pulmones. Después de añadir PBS para una suspensión al 10% (p/v), el pulmón aislado fue homogenado usando un sistema de mortero desechable (Fisher Scientific). La dosis infecciosa de huevo 50% (EID₅₀) se determinó mediante titulación serial del homogenado pulmonar en los huevos por Charles River Avian Vaccine Services. En resumen, las diluciones seriales de los homogenados tisulares fueron inoculadas en los huevos, y los valores EID₅₀ml⁻¹ fueron calculados según el método de Reed and Muench. Todos los ensayos se realizaron de forma ciega para el operador.

Estimulación de esplenocitos y tinción de citoquinas intracelular para respuesta anti-OVA y virus de la gripe.

Cuatro días después de la exposición tal como se ha descrito anteriormente (cuatro semanas después de la inmunización inicial), se cultivaron los esplenocitos de un ratón individual, y los eritrocitos fueron lisados usando un tampón ACK. Los leucocitos se resuspendieron en un medio RPMI 1640 y se incubaron durante 5 horas en presencia de un inhibidor de la función de Golgi (Golgi plug, BD Biosciences), y 1 µgml⁻¹ de OVA o virus de la gripe MHC I Clase I (OVA [257 - 264] SIINFEKL (ID SEC NO. 1) o virus de la gripe A NP [366 - 374] ASNENMETM (ID SEC NO. 2)), y péptidos II (OVA [323-339] ISQAVHAHAHAEINEAGR (ID SEC NO. 3) o virus de la gripe A NP [311 - 325] QVYSLIRPNENPAHK (ID SEC NO. 4)) para la estimulación de los linfocitos T. Se realizó una tinción de superficie multi-parámetros para CD3s, CD4, y CD8a, (CD3ε: clon 145-2C11; CD4: clon RM4-5; CD8α: clon 53-6.7, BD Biosciences), seguida de la fijación, permeabilización en solución BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante y tinción celular para IFN-γ o IL-17A o IL-5 (IFN-γ: clon XMG1.2; IL-17A: TCI 1-18H10 o IL-5: TRFK5, BD Biosciences). Se estimuló el control positivo con PMA/Ionomicina. Se realizó una citometría de flujo en un Láser BD 4 LSR II (BD Biosciences). Las subpoblaciones celulares, incluyendo OVA- o virus de la gripe específico IFN-γ o IL-17A o IL-5 que producen células auxiliares T CD3+CD4+ y células citotóxicas T CD3+CD8+ se cuantificaron como porcentaje en células viables totales por citometría de flujo. El análisis se completó usando el software BD FACSDiva™ 6.0 (BD Biosciences) y el *gating* se completó usando un método de 'fluorescencia menos uno' (FMO).

Análisis estadístico. Los tests estadísticos se realizaron bajo la supervisión de una bioestadística, la Dra. Musie Ghebremichael del Ragon Institute en Massachusetts General Hospital. Se determinaron los tamaños de las pruebas apropiados y los métodos estadísticos. El U-test Mann Whitney para la comparación de los valores numéricos entre dos grupos. El test Kruskal-Wallis se usó para las comparaciones de más de tres grupos. La comparación de supervivencia se hizo usando el test Gehan-Breslow-Wilcoxon. Los datos fueron agrupados a partir de al menos dos experimentos independientes, salvo indicación contraria a lo mencionado.

Ejemplo 1. Parámetros del láser no dañino para los tejidos

Se estableció una dosis no dañina para los tejidos para los láseres visibles previamente usados e infrarrojos cercanos ("NIR"). A lo largo de este estudio se usó un láser de ortovanadato de itrio dopado con neodimio (Nd:YVO4). A 1064 nm, el láser produce ya sea pulsos de onda continua (CW) o de duración de nanosegundos (PW) con una periodicidad de 10 kHz, mientras que a 532 nm solo produce PW. Se conformó el perfil del haz para que fuera relativamente plano, con menos de una variación del 50% en la intensidad del haz del centro al borde. El tamaño del punto de láser sobre la piel fue de aprox. 5 mm, resultando en un área de exposición de aprox. 0,2 cm². Se evaluaron los daños en el tejido por inspección visual e histología tras la iluminación del láser. Los ratones recibieron iluminación láser de onda continua (CW) o pulsada en nanosegundos (PW) 1064 nm o PW 532nm en cuatro áreas de la piel rasurada y depilada durante tres minutos. La temperatura de la superficie de la piel se controló con un termómetro de infrarrojos. (FIG. 1 A-C, columnas de la izquierda) Interacciones de dosis-temperatura del láser PW 532 nm, láser PW 1064 nm, y láser CW 1064 nm en la piel del ratón. 200mV (1 V/cm²) para los láseres PW 532 nm y 1000 mV (5 Vcm⁻²) para los PW y CW 1064 nm son las dosis máximas que no alcanzan el umbral de daños en la parte inferior de la espalda (42°C), n = 1-4 para cada grupo. 5,0 Vcm⁻² se identificó como la radiación máxima segura tanto para el láser 1064 nm PW como CW, y 1,0 Vcm⁻² para el láser PW 532 nm (FIG. 1a-c) Imágenes (FIG. 1A-C, columnas de la derecha) del lomo del ratón para inspección visual a las 0 y 24 horas después de la iluminación láser cutánea. No se observaron daños visibles como se evidenciaría por eritema, edema tisular o moratones, detectados si la potencia es inferior a 200mV para los láseres PW 532 nm y 1000 mV para PW y CW 1064 nm. Las cabezas de flecha demuestran el daño visible en la piel, n =1-4 para cada grupo. Se presentan las imágenes representativas de cada grupo.

Con el láser pulsado 532 nm (ancho de pulso 10 ns, 10 kHz), no se observó daño o inflamación significativos, ni apoptosis (FIG. 2A), hasta los 200 mV (1000 mV/cm²). Con el láser de onda continua de 1064 nm (CW) o pulsado (ancho de pulso 10 ns, 10 kHz), no se observó daño, apoptosis (FIG. 2B), ni inflamación a 1000 mV (5000 mV/cm²). Las FIG. 2A y 2B son un conjunto de fotomicrografías que muestran los daños microscópicos mediante los parámetros no dañinos para los tejidos del adyuvante del láser. Se evaluó el daño en la piel a las 0, 6, 24 horas después de la iluminación láser mediante histología. Se muestran las imágenes del transcurso de tiempo de la histología de la piel del ratón con 4 min de PW 532 nm (200 mV) y 4 min de CW 1064 nm (1000 mV). Se evaluaron los daños en la piel a las 0, 6, 24 horas después de la iluminación láser mediante histología. Las 3 columnas de la izquierda muestran imágenes del tejido de la piel teñido con TUNEL. Se tiñeron secciones del bloque de parafina de cinco micras de espesor usando el Kit Cell Death Detection TMR Rojo (Roche). Las células apoptóticas se tiñeron de rojo, los núcleos se identificaron mediante tinción de contraste usando tinte To-Pro-3 (azul). No se observaron daños en ningún momento temporal determinado. La barra indica 50 µm. Las columnas más a la derecha de las FIG. 2A-B muestran imágenes del tejido de la piel teñido con hematoxilina-eosina. No se observó respuesta de daños o inflamatoria tal como se evidenciaría por infiltración celular leucocitaria y mononuclear en ningún momento temporal determinado usando esta metodología. La barra indica 50 µm (a-c) n = 2-4 para cada grupo. Se presentan las imágenes representativas de cada grupo.

Ejemplo 2. Evaluación del adyuvante láser usando un modelo de vacuna de laboratorio OVA

Para determinar si el tratamiento con láser podría mejorar las respuestas inmunes en ratones, los ratones recibieron primero exposiciones de 1- o 4-min al láser CW o PW 1064 nm o PW 532 nm en el punto de vacunación subsiguiente. Después de la exposición, los ratones recibieron una inyección intradérmica (i.d.) de 40 µg de ovoalbúmina (OVA). (OVA, Worthington Biochemicals, 10 µg en 10µl solución salina en 4 puntos, 40 µg en total). Se usó alumbre (Imject, Fisher-Thermo) como adyuvante de control positivo.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

4 min láser + OVA (40 ug) i.d.

1 min láser + OVA (40 ug) i.d.

45 OVA (40 ug) + alumbre i.d.

OVA (40 ug) + alumbre i.m.

OVA (40 ug) i.d. solo

Los títulos de anticuerpos para OVA fueron medidos mediante ELISA para IgG específica OVA a las 3, 6, y 12 semanas después de la vacunación. Una co-inyección de alumbre con OVA sirvió como controles positivos. El título de anticuerpos del grupo de láser de 4-min PW 532 nm fue significativamente mayor que el de los controles sin adyuvante a las 6 semanas (Fig. 3). Sin embargo, su efecto adyuvante fue significativamente menor comparado con los controles de adyuvante de alumbre. Ambas dosis de láser PW 1064 nm con parámetros comparables a los grupos del láser PW 532 nm mostraron un número significativamente más elevado de títulos de anticuerpos que los controles sin adyuvante a las 6 semanas. Notablemente, el tratamiento láser de 1-min CW 1064 nm indujo al título de anticuerpos más alto que fue equivalente al de los controles con adyuvante de alumbre, y significativamente más alto que los controles sin adyuvante y el grupo de láser PW 532 nm en todos los momentos temporales.

Ejemplo 3. Efecto del adyuvante láser en el modelo de vacunación de la gripe murina

Para determinar si un láser infrarrojo puede mejorar una respuesta inmunitaria a las vacunas y si puede conferir una protección adecuada contra los patógenos, se usó un modelo de ratón de infección con gripe para demostrar la

capacidad del adyuvante láser infrarrojo para proporcionar inmunidad protectora frente a un patógeno. Los ratones fueron preparados y expuestos al láser tal como se ha descrito anteriormente, usando los láseres Nd:YVO4 a 532 nm (pulsado) y 1064 nm (onda continua), y 1460 nm (pulsado). Los ratones C57BL/6J recibieron una dosis de láser en un solo punto de vacunación y se les inyectó i.d. con 1 µg del virus de la gripe totalmente inactivado A/PR/8/34 (Charles River Avian Vaccine Services, 1 µg en 10 µl solución salina) con o sin iluminación láser, lípido monofosforil A (MPL) o alumbre. La vacunación intramuscular (i.m.) con 1 µg de dosis de la vacuna sirvió como control positivo. Se analizó la producción de anticuerpos específicos de la gripe mediante medición de los títulos de IgG total y sus subclases con ELISA y el ensayo de inhibición de hemoaglutinación del virus de la gripe (HAI). Se tomaron muestras después del día 28 tras la inmunización y a los 4 días post-exposición con una aplicación intranasal del virus de la gripe (1,5 x 10⁶ dosis infecciosa de huevo 50% por ratón) 4 semanas después de la vacunación.

La FIG. 5A-C demuestra los títulos de isotipo IgG específicos de la gripe en suero en estado post-exposición (4 días después de la exposición). La FIG. 4A-C títulos subclase IgG en estado pre-exposición (4 semanas después de la vacunación). (FIG. 4A y 5A) títulos IgG, (FIG. 4B y 5B) títulos IgG1, (FIG. 4C y 5C) títulos IgG2c. Grupos de control y experimentales: sin vacunación en estado post-exposición (FIG. 5A-C: n = 25) y pre-exposición (FIG. 4A-C: n = 38), no-adyuvante (inyección i.d. de vacuna de la gripe, FIG. 5A-C: n = 31; FIG. 4A-C: n = 49), tratados con láser 4-min PW 532 nm (inyección i.d. de la vacuna de la gripe con tratamiento láser, FIG. 5A-C: n = 13; FIG. 4A-C: n = 26), tratado con láser 1-min CW 1064 nm (FIG. 5A-C: n = 34; FIG. 4A-C: n = 52), inyectado con alumbre i.d. (FIG. 5A-C: n = 12; FIG. 4A-C: n = 12), inyectado i.d.-MPL (FIG. 5A-C: n = 12; FIG. 4A-C: n = 12), grupos inyectados i.m. (inyección i.m. de vacuna de la gripe, FIG. 5A-C: n = 16; FIG. 4A-C: n = 24), respectivamente. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo la Política del servicio de salud pública sobre cuidado humano de animales de laboratorio y aprobada por el Comité institucional de uso y cuidado de animales del Massachusetts General Hospital.

En la post-exposición, el láser CW 1064 nm aumentó significativamente los títulos de IgG, IgG1 e IgG2c comparado con el grupo sin adyuvante. Estos datos respaldan la opinión de que el tratamiento de láser CW 1064 nm aumenta el mix de respuesta inmunitaria de Th1 y Th2. El grupo de láser PW 532 nm mostró elevaciones más pronunciadas en los títulos de IgG2c que los controles sin adyuvante, lo que sugiere que este parámetro de láser aumenta la respuesta inmunitaria de Th1-sesgada. Como muestra la literatura, el alumbre indujo la respuesta inmunitaria de Th2-sesgada con subclase de anticuerpos célula-dependientes Th2 (IgG1). Los títulos de IgG y IgG2c inducidos por el adyuvante láser fueron superiores a los dos adyuvantes autorizados (alumbre y MPL). La eficacia del adyuvante alumbre es más alta que la del adyuvante láser en los títulos de IgG1, pero la respuesta inmunitaria de Th2-sesgada por este adyuvante está conectada a la hipersensibilidad mediada por IgE (ver FIG. 9). En la pre-exposición, el grupo de láser CW 1064 nm mostró aumento significativo de los títulos de IgG, IgG1 e IgG2c con respecto a los controles sin adyuvantes, pero todos los demás diferenciales que vimos en el estado post-exposición no estaban claros en este punto de tiempo particular. En conjunto, el adyuvante láser es apto para inducir una respuesta inmunitaria comparable a los adyuvantes autorizados.

Los títulos HAI séricos, como medición estándar de anticuerpos neutralizantes a la vacunación con virus de la gripe, tienden a ser superiores en los grupos de láser CW 1064 nm y PW 532 nm que en los grupos de control sin adyuvante e inyectados i.d. MPL, y también comparables a aquellos grupos con inyección i.d. de alumbre e inyectados i.m. Los resultados demostrados en la FIG. 6 sugieren que el adyuvante láser es apto para inducir una respuesta inmunitaria de anticuerpos comparable al adyuvante autorizado y a la vía convencional de vacunación de la vacuna de la gripe.

Ejemplo 4. Efecto del adyuvante láser en las respuestas inmunitarias celulares sistémicas

La inmunidad mediada por células es crítica para la protección del virus de la gripe. Para determinar si el láser provoca respuestas inmunitarias celulares sistémicas, se aislaron esplenocitos y reestimularon a partir de la exposición al virus de la gripe a los ratones *ex vivo* con péptidos del virus gripal, y después se evaluó la expresión de citoquinas en las subpoblaciones de linfocitos T por citometría de flujo.

Se determinaron las respuestas inmunitarias celulares sistémicas del cultivo de 5 h-de esplenocitos después del aislamiento de los ratones vacunados y no vacunados a los 4 días después de la exposición y reestimulación a la nucleoproteína de un péptido específico del virus gripal (NP) MHC clase I (NP 366- 374). Las células CD4+IFN-γ+ T-específicas del virus gripal así como las subpoblaciones CD4+IL-5+ inducidas con un péptido clase II MHC fueron significativamente superiores en el grupo tratado con láser 1064 nm (FIG. 8a, b). Estos datos son coherentes con el punto de vista de que el tratamiento con láser CW 1064 nm aumenta el mix de respuesta inmunitaria de Th1 y Th2, revelado por el análisis de subclase de IgG (FIG. 4 y 5). Como muestra la literatura, MPL indujo la respuesta inmunitaria Th1-sesgada como CD4+IFN-γ+ específica del virus gripal, pero no de CD4+IL-5+, la subpoblación de linfocitos T estaba significativamente aumentada. Ni la respuesta celular de CD4+IL-17+ ni CD8+ IFN-γ+ T era significativamente más alta en cualquiera de los grupos experimentales determinados (FIG. 8c, d). Estos datos demuestran que el láser CW 1064 nm aumenta la respuesta inmunitaria de Th1 y Th2, pero no de Th17 o linfocitos T citotóxicos en la vacunación con el virus de la gripe. Estos datos demuestran que el tratamiento con láser indujo una sólida respuesta inmunitaria celular sistémica a la vacunación con el virus de la gripe inactivado sin usar ningún adyuvante adicional.

La FIG. 9A demuestra los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones vacunados tras la exposición letal. La supervivencia del grupo tratado con láser CW 1064 nm fue significativamente mejor que en los grupos no vacunados sin adyuvante y tratados con láser PW 532 nm.

5 El tratamiento con láser 10 CW 1064 nm conferiría uniformemente una inmunidad protectora mejor frente a la exposición viral que el láser PW 532 nm, con vacuna i.d. sola, y sin vacuna, determinado por la medición del tiempo de supervivencia después de la exposición viral. (FIG. 9A).

10 La FIG. 9B demuestra el efecto del adyuvante láser en la eliminación viral. La dosis infecciosa de huevo 50% (EID₅₀) fue determinada por titulación serial del homogenado pulmonar en los huevos a los 4 días después de la exposición. El grupo del láser CW 1064 nm mostró un descenso marcado en los títulos virales en pulmón de un factor de 10^{2.4}, 10^{1.7} y 10^{2.0} comparado con los grupos tratados con láser PW 532 nm, control sin vacunación, control sin adyuvante, respectivamente, el día después de la exposición (FIG. 9B).

Ejemplo 5. Efecto del adyuvante láser en el modelo de vacunación del virus de la gripe murina (IgE)

15 Títulos séricos de IgE específicos del virus de la gripe en estado post-exposición (4 días después de la exposición). Los ratones fueron vacunados vía inyección i.d. o i.m. con el virus de la gripe inactivado (A/PR/8/34) con o sin iluminación láser, lípidos monofosforil A (MPL) o alumbre. Grupos experimentales y de control: sin vacunación (n = 8), sin adyuvante (inyección i.d. de vacuna gripal, n = 8), tratados 1-min con láser CW 1064 nm (inyección i.d. de vacuna gripal con tratamiento láser, n = 11), inyección i.d.- de alumbre (n = 12), inyección i.d de MPL (n = 12), grupos inyectados i.m.(inyección de vacuna gripal, n = 8), respectivamente. (FIG. 9) El adyuvante alumbre está conectado con la producción de IgE y posiblemente con hipersensibilidad, pero no con el adyuvante láser.

Ejemplo 6. Adyuvante láser para mejorar la respuesta inmunitaria a la vacuna de la polio

20 Aunque se han realizado progresos significativos en virtud de la iniciativa para la Erradicación mundial de la polio liderada por la Organización Mundial de la Salud, la poliomielitis sigue siendo endémica en el Sur de Asia y Nigeria y es una enfermedad infantil temida en estas zonas. La vacuna de la polio oral (OPV) y la vacuna de la polio inactivada (IPV) han reducido drásticamente la incidencia de la poliomielitis durante los últimos 50 años, pero ambas vacunas presentan claras limitaciones en la completación de la tarea de inmunización. La IPV requiere cuatro vacunaciones e induce solo una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos frente al virus y no un efecto protector contra la infección viral a través de la superficie mucosal. El requisito de las cuatro vacunas dificulta más completar el protocolo de vacunación y el resultado es la erradicación incompleta de la enfermedad en la comunidad. La OPV induce inmunidad mucosal y confiere una buena protección. Sin embargo, la posibilidad de persistencia viral y la reversión a un tipo salvaje virulento plantea preocupaciones de seguridad con respecto a la OPV.

25 Se utilizó láser de onda continua Nd:YV04 emitiendo luz a 1064 nm. El láser ilumina una pequeña área de la piel (unos 0,2 cm²) y genera un máximo de 2 vatios. Se usó una vacuna de la polio inactivada en un modelo de ratón establecido TgPVR21 o en un modelo de ratón ICR, la cepa de origen de los ratones transgénicos TgPVR21 usados en los estudios de protección de la vacuna de la polio (Nagata N et al., Virology 2004;321(1):87-100).

30 Se estableció que la potencia de láser máxima que, durante la exposición de un minuto en la piel del lomo rasurado de un ratón ICR, no eleva la temperatura de la superficie de la piel por encima de los 43°C (temperatura umbral para sensación de dolor en humanos). Como se ha descrito antes, este nivel de dosis es no dañina para la piel del ratón basado en la inspección histológica y visual exhaustiva. Los grupos de ratones fueron tratados con una serie de exposiciones de hasta un minuto a la potencia del láser con reducción gradual (por ej. 1.0 Vatios, 0,8 V, 0,6 V, 0,4 V) a lo que después siguió inmediatamente la vacunación intradérmica con poliovirus inactivados (1 µg en 10 µl de solución salina). Se obtuvieron las muestras de sangre a las 0, 3, 6, y 12 semanas post-vacunación y se cuantificaron los anticuerpos específicos de la polio (IgG) con ELISA. Se relacionó la curva de respuesta a la dosis y se identificó la dosis de láser óptima para la inmunización IPV del ratón ICR. Después se compararon los títulos de la media entre un curso de dos dosis de láser óptimo + IPV intradérmica (0 y 3 semanas) y un curso de tres dosis de IPV intramuscular sola (0, y 6 semanas) donde la dosis de antígenos de cada vacuna es la misma (Ip,g). Se muestreó la sangre a las 0, 3, 6, y 12 semanas post-vacunación para la cuantificación de anticuerpos específicos de la polio (IgG).

35 Se usó el modelo de ratón establecido TgPVR21 para demostrar la capacidad del régimen de láser + vacuna para proporcionar inmunidad protectora frente a la infección de la polio (Nagata N et al., Virology 2004;321(1):87-100). Se midió la capacidad del láser para inducir respuesta inmunitaria mucosal a IPV.

40 Se espera que la dosis adecuada de luz láser infrarroja, a los niveles de dosis y potencia no dañinos e indoloros en humanos, mejoren de forma similar la respuesta inmunitaria humoral en la inmunización intradérmica con IPV a un grado que lleve a reducir el número de vacunas de refuerzo, facilitando así conseguir una vacunación con IPV protectora.

Ejemplo 7 Adyuvante láser y Captación, maduración y migración de células dendríticas

El tratamiento adecuado y oportuno de las células dendríticas (DCs) de la piel en los nodos linfáticos (LNs), donde las DCs interactúan con los linfocitos T y B y median la presentación de antígenos a través de los vasos linfáticos en la piel, es crucial para la ejecución de sus funciones (Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. (2005) Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5(8): 617-28). La migración directa de DC está mediada por la expresión selectiva de receptores de quimioquinas y por la generación de quimioquinas específicas en órganos inmunes (Trombetta ES, Mellman I. (2005) *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028; Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. (2005) *Nat Rev Immunol* 5(8): 617-28; Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Forster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A. (1999) *Eur J Immunol* 29(5): 1617-25; Vecchi A, Massimiliano L, Ramponi S, Luini W, Bemasconi S, Bonecchi R, Allavena P, Parmentier M, Mantovani A, Sozzani S. (1999) *J Leukoc Biol* 66(3): 489-94). En la piel no estimulada, las LCs y DCs dérmicas son móviles para adquirir y procesar antígenos extraños. Estas expresan los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2, CCR5, y CCR6, así como CXCR3 y CXCR4 (Trombetta ES, Mellman I. (2005) *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028; Vecchi A, Massimiliano L, Ramponi S, Luini W, Bemasconi S, Bonecchi R, Allavena P, Parmentier M, Mantovani A, Sozzani S. (1999) *J Leukoc Biol* 66(3): 489-94). Las DCs regulan a la baja la mayoría de receptores de quimioquinas durante su proceso de maduración, con la excepción de CXCR4 y CCR7, tras la exposición a señales inflamatorias como quimioquinas o citoquinas (por ej. IL-8 o TNF-alfa) (Luster AD, Weinshank RL, Feinman R, Ravetch JV. (1988) *J Biol Chem* 263(24): 12036-43; Proudfoot AE. (2002) *Nat Rev Immunol* 2(2): 106-15) y antígenos extraños (por ej. ligandos LPS o TLR) (De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O, Moser M. (1996) *J Exp Med* 184(4): 1413-24; Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE. (2000) *Immunol Cell Biol* 78(2): 91-102). CXCR4 está altamente expresado en las DCs de la piel migradas *en vivo* (Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, Sakabe J, Yoshiki R, Tamamura H, Fujii N, Inaba K, Tokura Y. (2007) *Am J Pathol* 171(4): 1249-57) y media la migración direccional (Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, Sakabe J, Yoshiki R, Tamamura H, Fujii N, Inaba K, Tokura Y. (2007) *Am J Pathol* 171(4): 1249-57; Humrich JY, Humrich JH, Averbek M, Thumann P, Termeer C, Kampgen E, Schuler G, Jenne L. (2006) *Immunology* 117(2): 238-47; Ouwehand K, Santegoets SJ, Bruynzeel DP, Scheper RJ, de Gruij TD, Gibbs S. *Eur J Immunol* 38(11): 3050-9).

Para identificar las citoquinas inducidas por iluminación láser, se realizó un análisis qPCR sobre el tejido de piel expuesto al láser. La interleucina-6 (IL-6) y CCR7, que son críticas para la maduración y migración de las células dendríticas residentes en la piel, fueron altamente reguladas al alza después del tratamiento con láser entre +160 citoquinas y sus receptores examinados (IL-6: 6,1 veces; CCR7: 4,4 veces comparado con el tejido dérmico no iluminado, n = 3 para cada gen). Sorprendentemente, la iluminación láser no regula al alza las citoquinas inflamatorias clásicas tales como TNF α , IL1 β , o IFN- γ . IL6 se expresa en capa media de la epidermis (presumiblemente queranocitos), más sustancialmente a las 6 horas de la post-iluminación.

El análisis inmunofluorescente se realizó para determinar la distribución espacial y temporal de IL-6. La piel del lomo del ratón iluminada con el láser indujo la expresión IL-6 en la capa media epidermal, adyacente a las células de Langerhans (células dendríticas residentes en la piel). El nivel de expresión máximo se alcanzó a las 6 horas tras la aplicación del láser.

Dado que la magnitud a la respuesta inmunitaria depende de la cantidad de DCs que migran a los órganos linfoides secundarios (Leroux-Roels G. (2010) Reed et al. (2009); Palucka K, Banchereau J, Mellman I. (2010) *Immunity* 33(4): 464-78), las citoquinas inducidas por la iluminación láser en la piel pueden jugar un papel crítico en el inicio de la respuesta inmunitaria de la piel.

El análisis de transcriptoma por PCR cuantitativo en tiempo real en la piel del ratón tratado con láser demostró que la iluminación láser (tanto PW 532 como CW 1064nm) regula al alza selectivamente una serie uniforme de genes que son conocidos por asociarse con la captación y activación de células dendríticas, incluyendo cc12, ccl17, ccl20, cxcl1, cxcl13, ccr7, ptgs2 (COX-2), e IL6 (datos no mostrados). La iluminación láser CW1064 nm no regula al alza las citoquinas inflamatorias clásicas como TNF-alfa, IL1-beta, IFN-gamma, pero PW 532 sí lo hace. Adicionalmente, la histología reveló la acumulación de células dendríticas CD11c+, que son el antígeno más versátil que presentan las células en la piel, en el punto donde se aplicó el láser CW 1064 nm sin inducir ningún daño tisular. Sin pretender estar limitado por la teoría, actualmente se cree que la expresión de un cóctel de citoquinas inducidas por el adyuvante láser puede ser asociada a la captación, migración y activación de células dendríticas y el efecto adyuvante.

Otras realizaciones

Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con su descripción detallada en el presente documento, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> La General Hospital Corporation
- 5 <120> Adyuvantes láser para mejorar la respuesta inmunitaria
- <130> 29539-0044W01
- <150> US 61/530,296
- 10 <151> 2011-09-01
- <160> 4
- <170> SEC rápida para Windows Versión 4.0
- 15 <210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> péptido nucleoproteína OVA específico MHC clase I
<400> 1
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5
- 25 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> péptido nucleoproteína virus de la gripe específico MHC clase I
<400> 2
Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5
- <210> 3
<211> 17
<212> PRT
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> péptido nucleoproteína OVA específico MHC clase II

ES 2 631 156 T3

<400> 3

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15
Arg

<210> 4

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido nucleoproteína virus de la gripe específico MHC clase II

10

<400> 4

Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu Asn Pro Ala His Lys
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un antígeno para el uso de un método para mejorar la respuesta inmunitaria protectora al antígeno en un sujeto, donde método comprende:
- 5 exponer la piel del sujeto a radiación de longitud de onda de entre 1050 nm y 1080 nm, donde la radiación es una dosis total de radiación infrarroja cercana de entre 25 J y 1200 J; y
- administrar al sujeto una dosis del antígeno, donde el antígeno está administrado intradérmicamente en o inmediatamente adyacente a la piel expuesta a la radiación, caracterizada por:
- la radiación es una radiación de onda continua.
- 10 2. El antígeno para el uso de la reivindicación 1, donde la radiación de onda continua tiene una longitud de onda de 1064 nm
- 3.El antígeno para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la radiación comprende radiación láser, preferiblemente el láser que sea un láser granate de aluminio de itrio dopado con neodimio (Nd:YAG).
4. El antígeno para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el antígeno comprende ácido nucleico o proteínas.
- 15 5. El antígeno para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el antígeno es viral, bacteriano, fúngico, parásito unicelular o multicelular o una parte de ellos.
- 6.El antígeno para el uso de la reivindicación 5, donde el antígeno es un virus de la gripe o una parte del mismo.
- 7.El antígeno para el uso de la reivindicación 5, donde el antígeno proviene de la polio, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, virus de la gripe, tuberculosis (Bacillus Calmette-Guerin (BCG)), sarampión, toxina del tétanos, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre amarilla, difteria-tétanos-pertussis, virus del papiloma humano, vacuna conjugada de meningitis multivalente, vacuna antineumocócica conjugada o patógeno de la rabia.
- 20 8.El antígeno para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tiempo total de exposición está entre 10 s y 300 s.
- 9.El antígeno para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el perfil de intensidad trans-seccional de la radiación es sustancialmente de forma parabólica.
- 25 10.El antígeno para el uso de las reivindicaciones 1-2 o 4-9, donde la radiación consta de la radiación producida por una fuente no láser.
- 11.El antígeno para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la radiación media es V/cm^2 .
- 30 12.El antígeno para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la radiación media está entre 1 V/cm^2 y 5 V/cm^2 .

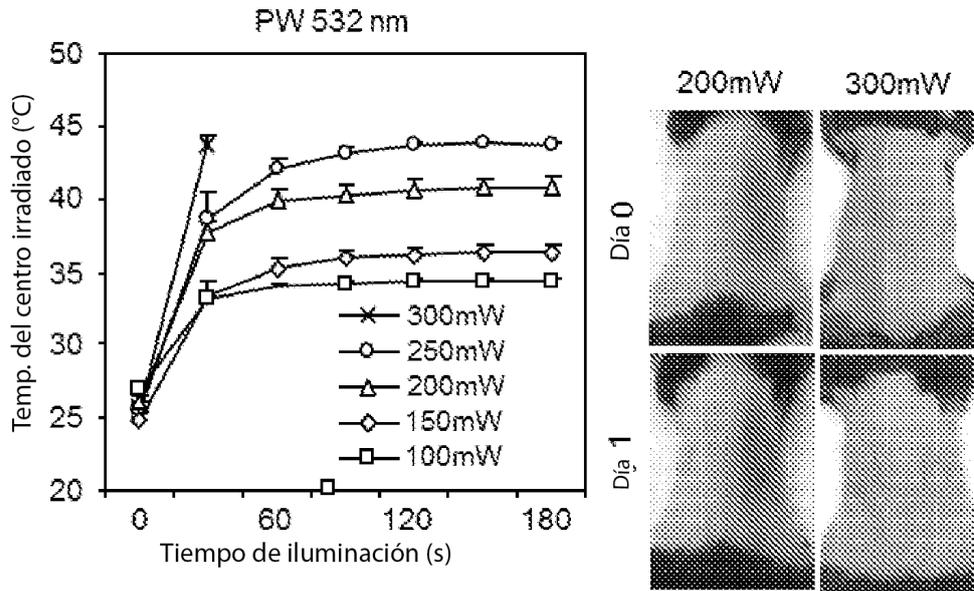


FIG. 1A

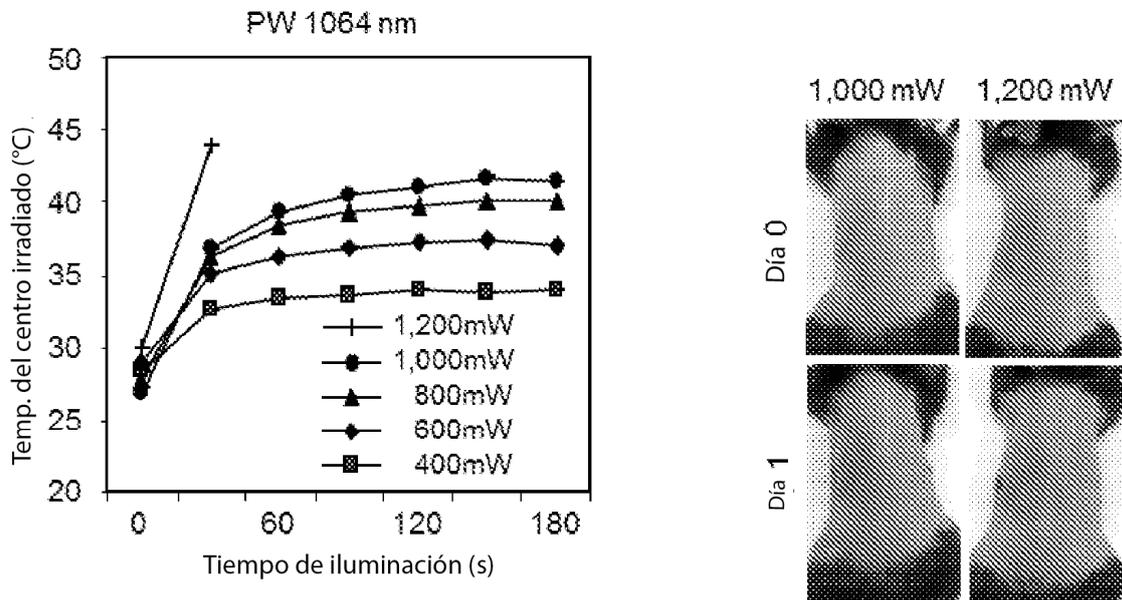


FIG. 1B

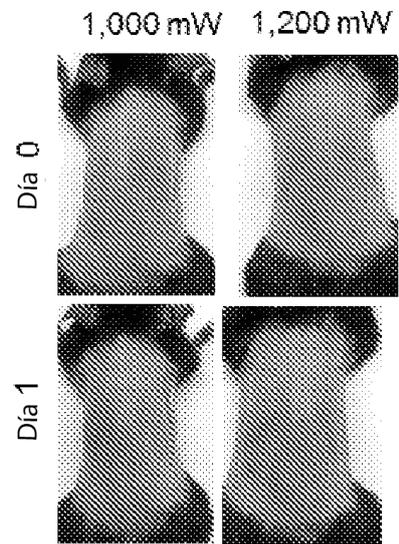
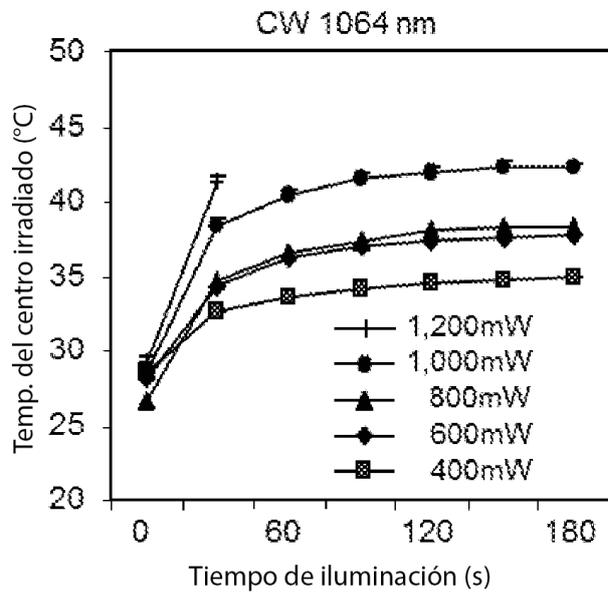


FIG. 1C

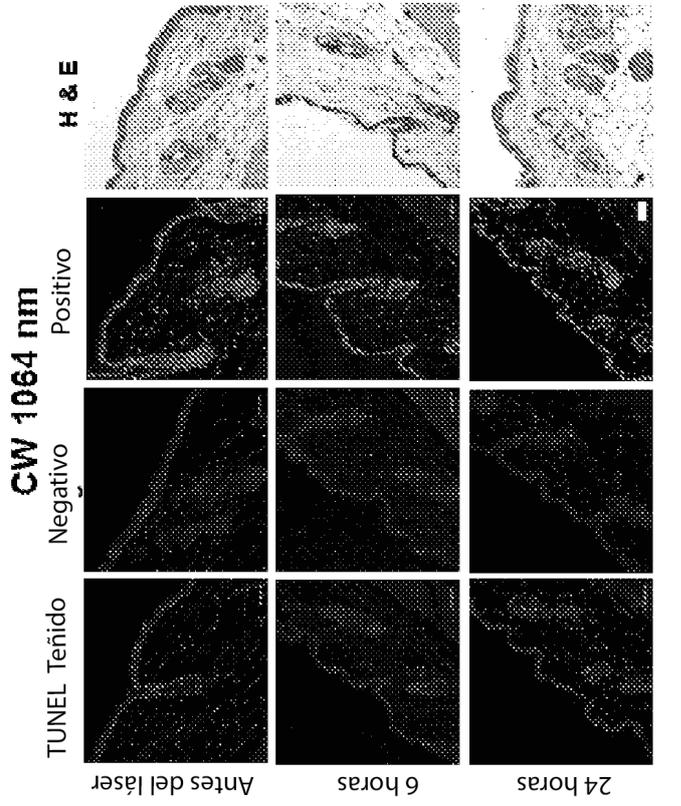


FIG. 2B

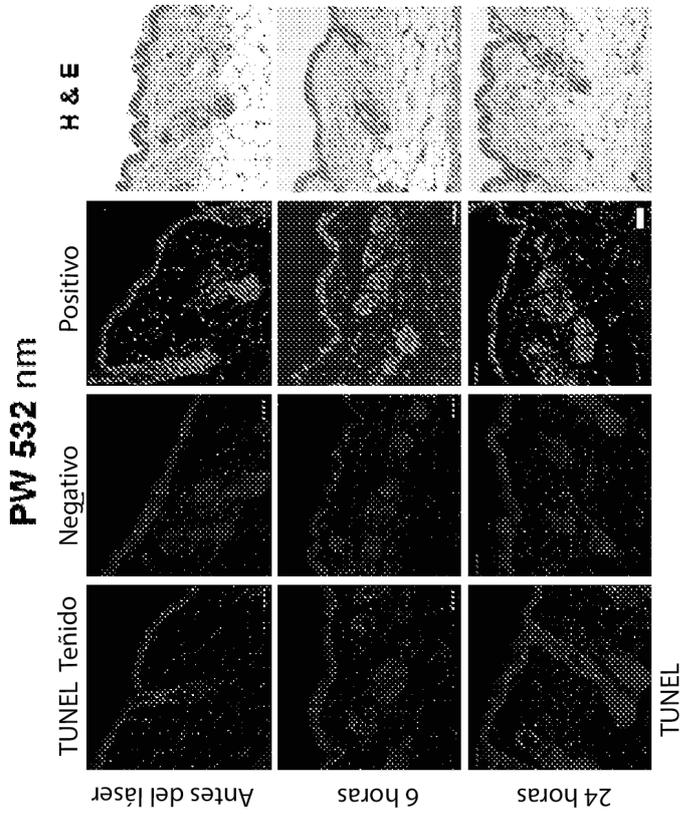


FIG. 2A

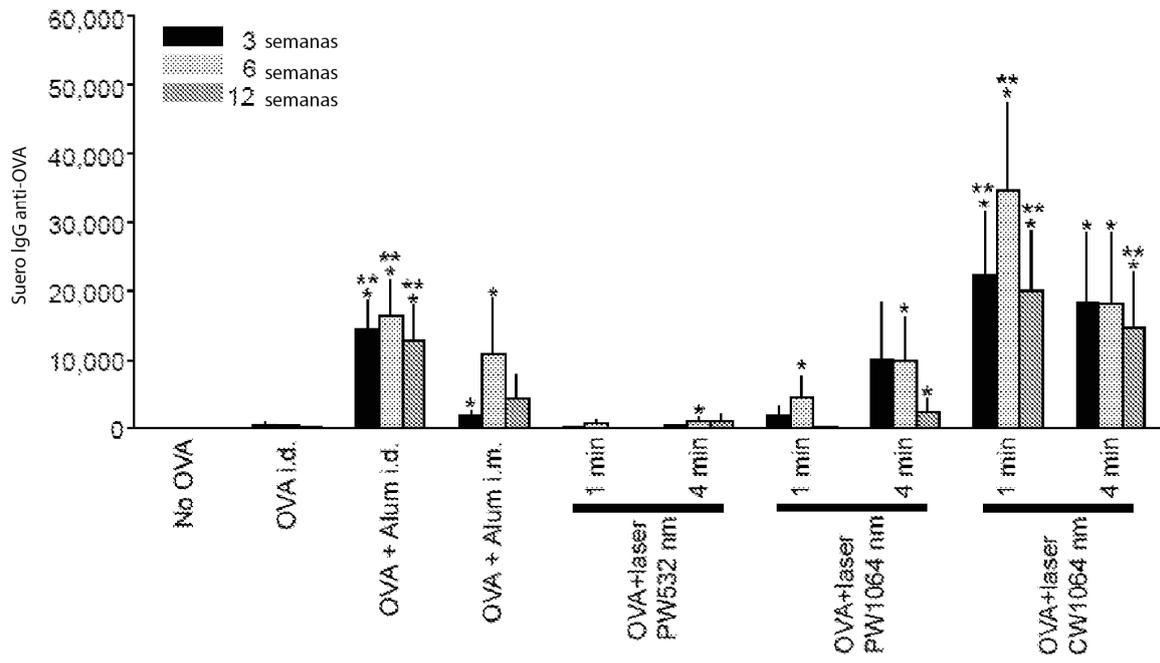


FIG. 3

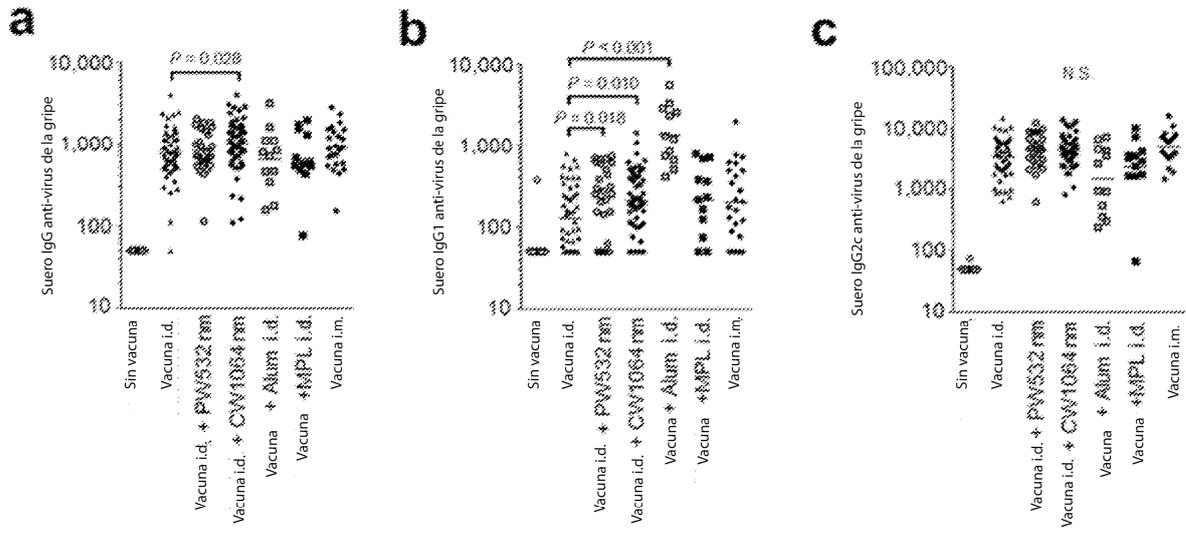


FIG. 4

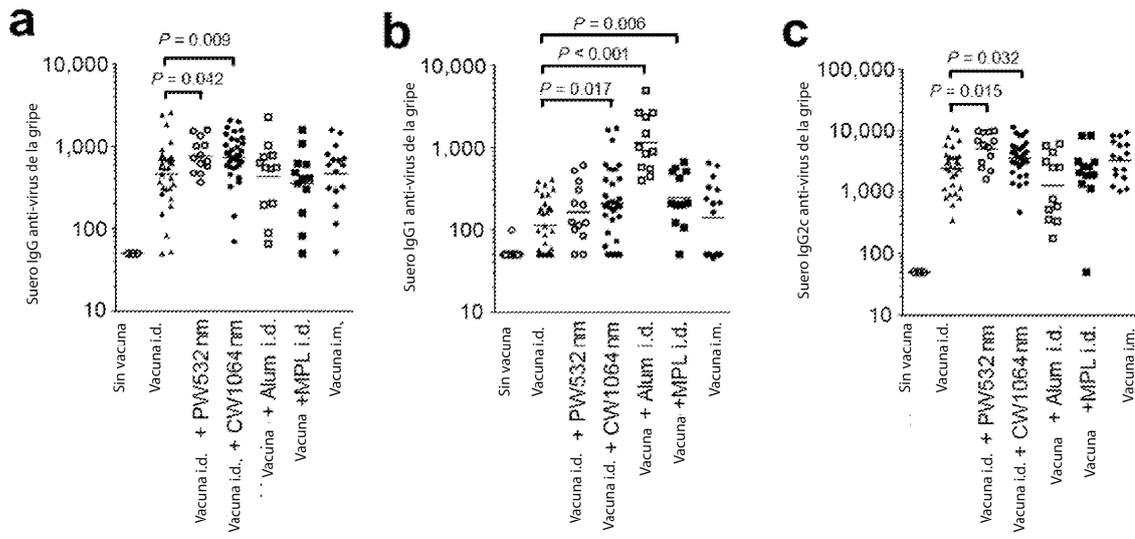


FIG. 5

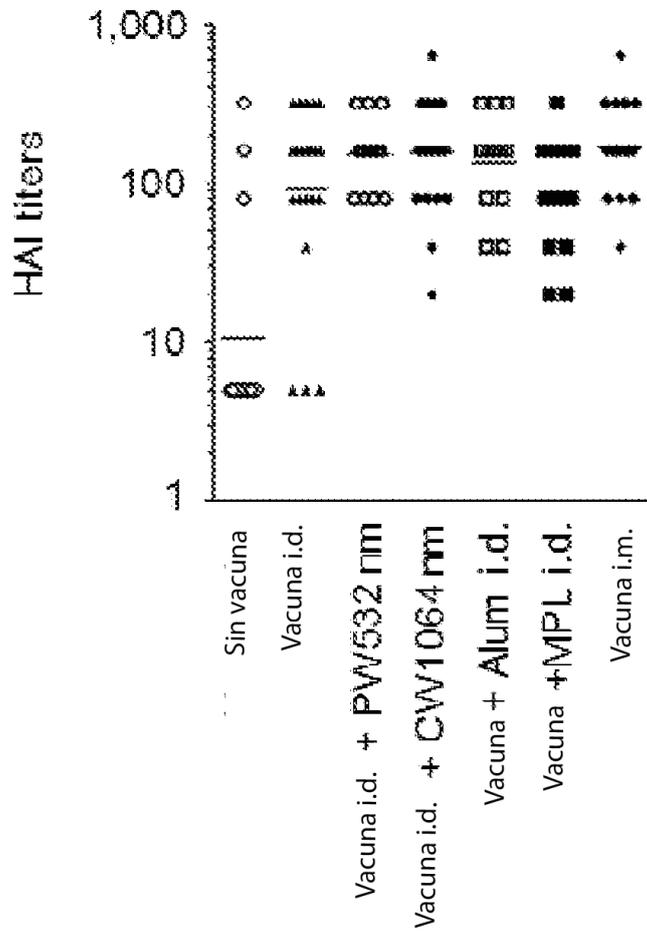


FIG. 6

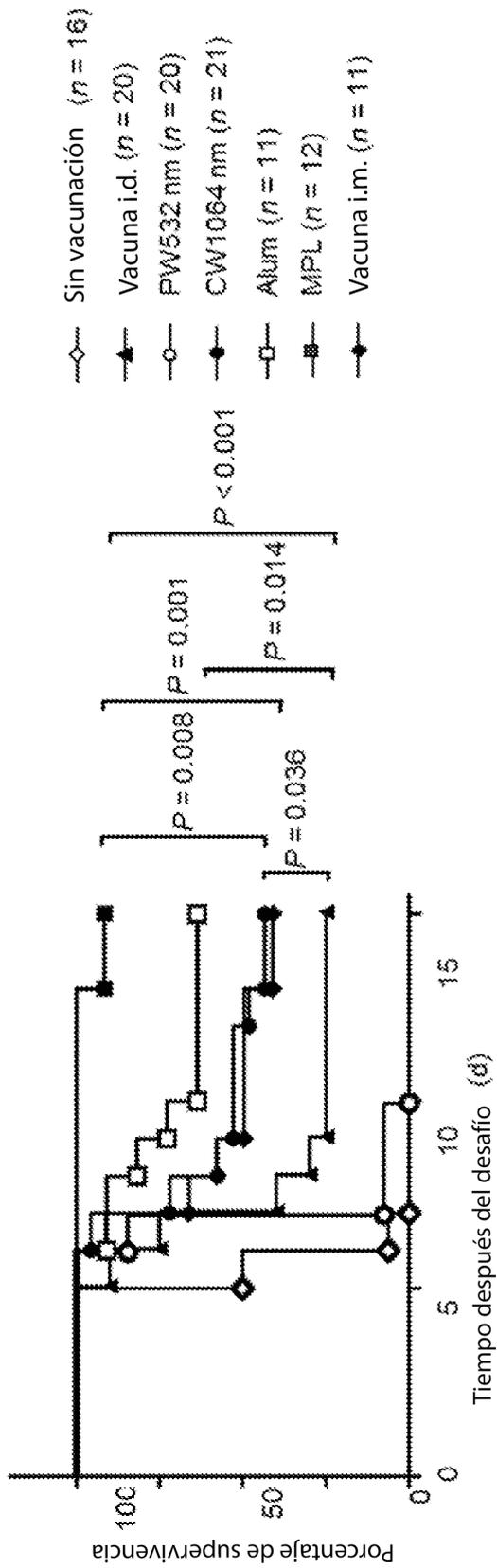


FIG. 7A

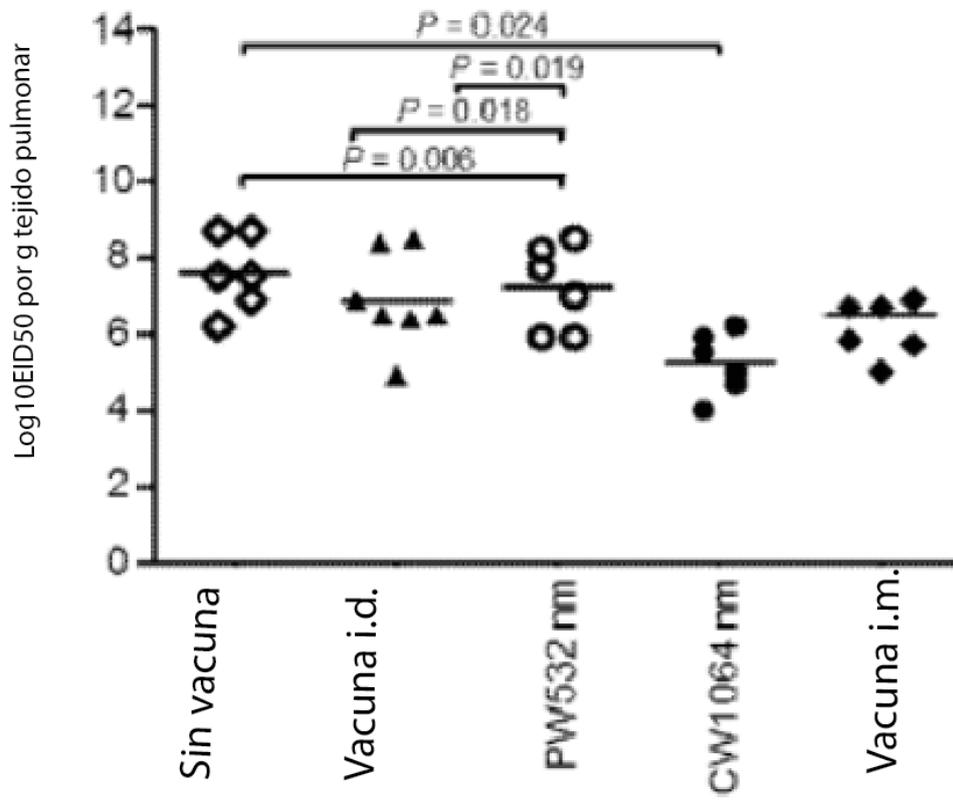


FIG. 7B

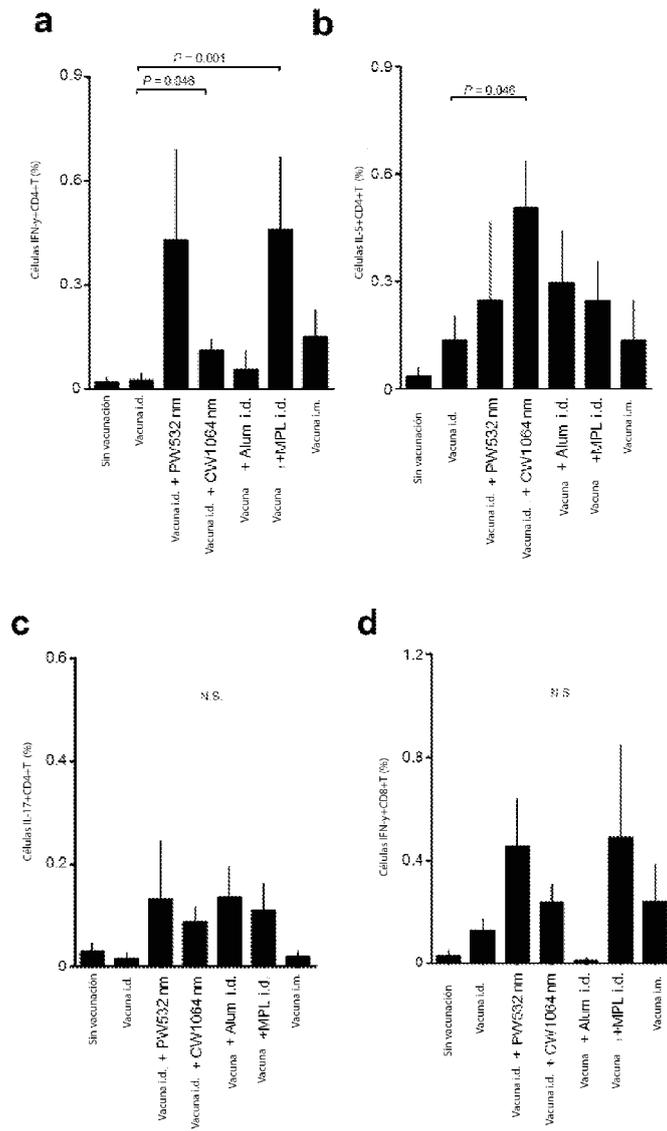


FIG. 8

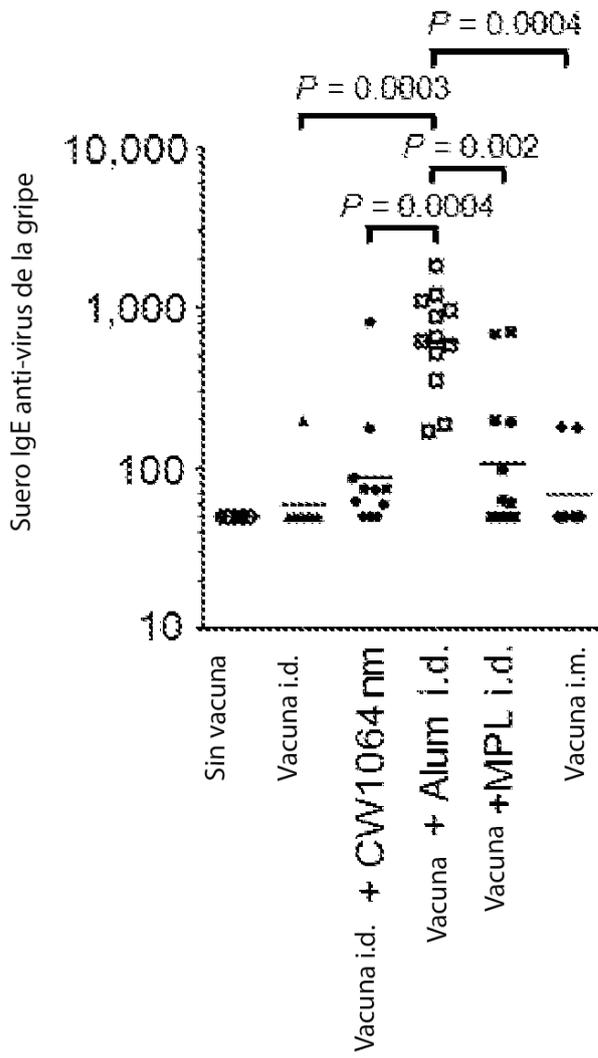


FIG. 9