



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 625**

51 Int. Cl.:  
**A61M 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02803296 .9**

96 Fecha de presentación : **29.10.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1439870**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2004**

54 Título: **Dispositivo para la administración de una sustancia.**

30 Prioridad: **29.10.2001 US 330713 P**  
**27.11.2001 US 333162 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.05.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.05.2009**

73 Titular/es: **Becton, Dickinson and Company**  
**Intellectual Property Department, 1 Becton Drive,**  
**Mail Code 089**  
**Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US**

72 Inventor/es: **Mikszta, John, A.;**  
**Pettis, Ronald, J.;**  
**Alarcon, Jason;**  
**Brittingham, John, M. y**  
**Dekker, III, John, P.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 319 625 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**

Dispositivo para la administración de una sustancia.

5 Esta solicitud de patente reivindica prioridad respecto a las solicitudes de patente provisional de EE.UU. nos. 60/330.713 y 60/333.162, presentadas respectivamente, el 29 de Octubre de 2001 y el 27 de Noviembre de 2001.

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un dispositivo de abrasión de la piel.

**Fundamento de la invención**

15 La distribución o administración de sustancias al cuerpo a través de la piel ha sido, típicamente, invasiva, implicando el uso de agujas y jeringuillas para facilitar la inyección intradérmica (ID), intramuscular (IM) o subcutánea (SC). Estos métodos son dolorosos para el sujeto, requieren la habilidad de un practicante entrenado y, con frecuencia, producen hemorragia. Se han llevado a cabo esfuerzos para superar estas desventajas mediante el uso de dispositivos que producen abrasión del estrato córneo, la capa delgada externa de células queratinizadas de 10-20  $\mu$ m de grosor, aproximadamente. La sustancia bioactiva es distribuida a la epidermis viable expuesta.

20 Esta técnica evita la red nerviosa y coloca la sustancia bioactiva en estrecha proximidad con los vasos sanguíneos y linfáticos para absorber y distribuir la sustancia a todo el cuerpo.

25 Para la administración tópica de vacunas, la propia epidermis es una diana especialmente deseable ya que es rica en células que presentan antígeno. En comparación, la capa dérmica situada por debajo de la epidermis contiene menos células que presentan antígeno. Además, el estrato córneo y la epidermis no contienen nervios ni vasos sanguíneos, por lo que este método tiene la ventaja de ser especialmente indoloro y sin sangre al tiempo que proporciona acceso a las capas de piel capaces de responder al antígeno.

30 La técnica anterior informa de una diversidad de dispositivos y métodos para romper el estrato córneo con la finalidad de administrar sustancias al cuerpo. Por ejemplo, la rotura del estrato córneo puede conseguirse por punción como enseña la patente de EE.UU. No. 5.679.647 otorgada a Carson *et al.* Esta patente enseña que puntas de pequeño diámetro tales como las que se encuentran en los dispositivos usados para ensayos de tuberculina en la piel y ensayos de alergia, pueden revestirse con polinucleótidos u oligonucleótidos y usarse para distribuir tales materiales en la piel. 35 El método de uso de tales dispositivos implica la punción de la piel con las puntas, dando por resultado la inyección intracutánea de la sustancia del revestimiento.

40 La patente de EE.UU. No. 5.003.987; la patente de EE.UU. No. 5.879.326; y la patente de EE.UU. No. 3.964.482 enseñan la ruptura del estrato córneo por corte.

45 El documento EP 1 086 719 describe un método y un dispositivo para erosionar la piel antes de distribuir un fármaco. El documento US 6.334.856 describe un dispositivo de microaguja para inyectar fluidos a través del estrato córneo. El documento WO 02/085446 describe una disposición de microproyección para perforar o cortar el estrato córneo. El documento WO 02/32331 describe una microestructura para exfoliar la piel. El documento WO 03/026732 describe una disposición de microaguja que puede cambiarse.

**Sumario de la invención**

50 La presente invención se refiere a un dispositivo de abrasión de la piel, y en particular, el estrato córneo de la piel.

55 Las sustancias a administrar comprenden, en particular, sustancias bioactivas, incluyendo agentes farmacéuticos, medicamentos, vacunas y sustancias semejantes. Las sustancias pueden estar en forma sólida o líquida, dependiendo de la formulación y del método de administración. Estas sustancias pueden administrarse, *inter alia*, en forma de polvos secos, geles, soluciones, suspensiones y cremas. Formulaciones adecuadas son familiares para los expertos en la técnica. Los medicamentos particularmente preferidos para administrar mediante los métodos de la invención, incluyen vacunas, alérgenos y agentes terapéuticos génicos.

60 Un aspecto de la invención se refiere a un dispositivo para preparar un sitio de distribución sobre la piel, para potenciar la administración de un agente farmacéutico a través del estrato córneo de la piel a una profundidad suficiente donde el agente farmacéutico pueda ser absorbido y utilizado por el cuerpo.

65 El tejido dérmico representa un sitio diana atractivo para la distribución de vacunas y de agentes terapéuticos génicos. En el caso de las vacunas, (tanto genéticas como convencionales), la piel es un sitio de administración interesante debido a la alta concentración de células que presentan antígeno (APC) y precursoras de APC, que se encuentran en este tejido, en especial las células epidérmicas de Langerhan (LC). Diversos agentes terapéuticos están destinados al tratamiento de enfermedades de la piel, trastornos de la piel y cáncer de piel. En tales casos, es deseable la administración directa del agente terapéutico al tejido de piel afectado. Además, las células de la piel son una diana interesante para los agentes terapéuticos génicos, de los que la proteína o proteínas codificadas son activas en sitios distantes

desde la piel. En tales casos, las células de la piel (por ejemplo, los queratinocitos) pueden actuar como “reactores biológicos” produciendo una proteína terapéutica que puede ser absorbida con rapidez en la circulación sistémica mediante la dermis papilar. En otros casos, es deseable el acceso directo de la vacuna o del agente terapéutico a la circulación sistémica, para el tratamiento de trastornos distantes desde la piel. En tales casos, la distribución sistémica puede conseguirse a través de la dermis papilar.

La presente invención proporciona un dispositivo microabrasivo para erosionar la piel asociado con la distribución de una sustancia bioactiva, que incluye, pero no se limita a ellas, ácidos nucleicos, aminoácidos, derivados de aminoácidos, péptidos o polipéptidos. Se ha descubierto que los ácidos nucleicos exhiben una expresión génica intensificada y producen una respuesta inmunitaria potenciada a la proteína expresada cuando son distribuidos simultáneamente con la abrasión del estrato córneo. De modo semejante, los alérgenos administrados simultáneamente con la abrasión producen una respuesta inmunitaria más vigorosa que los métodos convencionales de ensayo de alérgenos.

En una realización preferida, la presente invención comprende un dispositivo microabrasivo para administrar una sustancia a la piel, que posee una base con una faceta abrasiva, a la que una superficie abrasiva que tiene una disposición de microprotuberancias que poseen al menos un borde de raspado, está unida, montada o formando un todo con ella, y una faceta de fijación de un mango, a la que está unido, montado, o formando un todo con ella, un mango u otro dispositivo de agarre. Por “superficie abrasiva” se entiende la superficie que es presentada a la piel durante el proceso de abrasión, incluyendo las microprotuberancias, la zona de superficie existente entre ellas y la superficie circundante.

El dispositivo microabrasivo de la presente invención es adecuado para distribuir una sustancia a la piel mediante el movimiento del dispositivo microabrasivo a de una parte a otra de una zona de la piel, para producir surcos de suficiente profundidad para permitir que la sustancia, que es administrada antes, al mismo tiempo o después de la abrasión de la piel, sea absorbida por la capa de piel previamente determinada. Por medio del presente dispositivo microabrasivo, varios pases del dispositivo a lo largo de la piel pueden dar por resultado surcos en la piel progresivamente más profundos, permitiendo con ello la administración de una sustancia a una profundidad deseada de la piel.

### Descripción de los dibujos

La Figura 1A es una vista en alzado del extremo de mango de una realización preferida.

La Figura 1B es una vista lateral de una realización preferida de un dispositivo microabrasivo.

La Figura 2A es una vista en perspectiva, transparente, del dispositivo microabrasivo de las Figuras 1A y 1B.

La Figura 2B es una vista en corte transversal del dispositivo microabrasivo de la Figura 1B.

La Figura 3 es una vista lateral de la superficie abrasiva del dispositivo microabrasivo de las Figuras 1A, 1B, 2A y 2B sobre la piel de un sujeto.

La Figura 4 es una vista en perspectiva de la superficie abrasiva de la realización de la Figura 3.

La Figura 4A es una vista lateral en corte transversal de la superficie del dispositivo abrasivo.

La Figura 5 es una vista del fondo de la superficie del dispositivo abrasivo de la realización de la Figura 3.

La Figura 6 es una vista en perspectiva en corte transversal parcial de surcos erosionados de la piel.

La Figura 7 ilustra niveles de actividad del gen informador en piel, obtenidos con los diversos protocolos de distribución de ácidos nucleicos ensayados en el Ejemplo 1.

La Figura 8 ilustra la actividad del gen informador en piel, obtenida variando el número de abrasiones, según se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 9 ilustra la actividad del gen informador en piel, obtenida variando la formulación de ácidos nucleicos y el protocolo de distribución, según se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 10 ilustra la respuesta de anticuerpo sérico que sigue a la administración de DNA plasmídico que codifica el Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (HbsAg), según se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 11 ilustra la actividad media de luciferasa ( $\pm$  SEM) en muestras de piel procedentes de ratas tratadas con un gen informador usando la técnica de inyección de estilo Mantoux (Grupo 1A), una disposición de microaguja de plástico, de la invención (Grupo 2A), un dispositivo de punta presionado contra la piel y raspando a lo largo de una zona de 0,06 cm<sup>2</sup> aproximadamente (Grupo 3A), un dispositivo de punta presionado contra la piel y movido a lo largo de una zona de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> (Grupo 4A), un dispositivo de punta presionado contra la piel y separado (Grupo 5A) y DNA plasmídico aplicado directamente en forma de gotitas a la piel rasurada (Grupo 6A).

La Figura 12 muestra reacciones de la piel después de aplicar histamina y someter a abrasión la piel de cerdos de destete, usando una disposición de microaguja de plástico, de la invención (Grupo 1B), un dispositivo de punta utilizado raspando una vez a lo largo de una zona de aproximadamente 0,06 cm<sup>2</sup> (Grupo 2B), un dispositivo de punta utilizado raspando varias veces para producir una zona raspada de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> (Grupo 3B) y un dispositivo de punta presionado contra la piel y retirado (Grupo 4B). Para cada uno de los grupos, los números 1-5 están reproducidos y "C" es un testigo al que se había aplicado histamina, sin someter a abrasión.

La Figura 13 expone la zona relativa de hinchazón para cada uno de los grupos indicados en la Figura 12 después de restar las medidas de hinchazón observadas con el uso del dispositivo sólo sin histamina..

Las Figuras 14 y 15 comparan la Pérdida de Agua Trans-Epidérmica (TEWL) desde la piel después de tratamiento con dispositivos microabrasivos de plástico y de silicio.

La Figura 16 ilustra actividad del gen informador en la piel después de la administración de DNA plasmídico que codifica un gen informador, usando dispositivos microabrasivos de plástico y de silicio.

La Figura 17 compara la respuesta de anticuerpo sérico después de la administración de un plásmido de DNA que codifica HBsAg usando dispositivos microabrasivos de plástico y de silicio.

La Figura 18 ilustra la respuesta de anticuerpo sérico después de administrar un plásmido de DNA que codifica hemaglutinina de la influenza (HA), plásmido puro.

La Figura 19 ilustra la respuesta de anticuerpo sérico después de administrar un plásmido de DNA que codifica hemaglutinina de la influenza (HA), plásmido más adyuvante

La Figura 20 ilustra la respuesta de anticuerpo sérico después de cebar con DNA plasmídico puro que codifica HA de la influenza, seguido de refuerzo con virus total de la influenza, inactivado.

La Figura 21 ilustra la respuesta de anticuerpo sérico después de cebar con DNA plasmídico que codifica HA de la influenza más adyuvante, seguido de refuerzo con virus total de la influenza, inactivado.

La Figura 22 ilustra la respuesta de anticuerpo sérico después de administrar vacuna de virus inactivados, del virus de la rabia.

La Figura 23 ilustra la respuesta de anticuerpo sérico después de administrar HBsAg mediante los protocolos de distribución descritos en el Ejemplo 11a.

La Figura 24 ilustra la respuesta proliferativa de células T después de administrar HBsAg.

La Figura 25 ilustra la respuesta inmunitaria celular a una vacuna del melanoma codificada por un vector adenoviral.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo para someter a abrasión el estrato córneo potenciando la administración de una sustancia a través del estrato córneo de la piel de un paciente.

Tal como se emplea en esta memoria, el término "abrasión" se refiere a la separación de una parte, por lo menos, del estrato córneo para aumentar la permeabilidad de la piel sin causar irritación excesiva de la piel ni comprometer la barrera de la piel a agentes infecciosos. Esto está en contraposición con la "punción" que produce orificios discretos a través del estrato córneo con zonas de estrato córneo sin romper existentes entre los orificios.

El dispositivo microabrasivo de la invención es un dispositivo capaz de erosionar la piel alcanzando este resultado. En realizaciones preferidas, el dispositivo es capaz de erosionar la piel penetrando con ello el estrato córneo sin perforar el estrato córneo. En una realización preferida el dispositivo microabrasivo incluye también una cantidad eficaz de la sustancia que ha de ser administrada. Esta sustancia puede estar incluida, por ejemplo, en un depósito que forma un todo con el dispositivo microabrasivo o que forma parte separable del mismo, o puede estar revestida sobre la superficie de distribución del dispositivo microabrasivo. Por "cantidad eficaz" de una sustancia se entiende que significa una cantidad que puede atraer una respuesta deseada en un sujeto, incluyendo, pero no limitándose a ello, una respuesta inmunoestimuladora o inmunomoduladora en el caso de un alérgeno o de una vacuna, u otra respuesta terapéutica o de diagnóstico.

Tal como se emplea en esta memoria, "penetración" se refiere a entrar en el estrato córneo sin atravesar completamente el estrato córneo y entrar en las capas adyacentes. Esto no quiere decir que el estrato córneo no pueda ser penetrado completamente para revelar la interfase de la capa subyacente de la piel. Perforación, por otra parte, se refiere a pasar completamente a través del estrato córneo y entrar en las capas adyacentes situadas por debajo del estrato córneo.

Se opina que el dispositivo microabrasivo de la invención posee una ventaja inmunológica única para la distribución de vacunas, con el potencial de aumentar el valor clínico de la vacuna. Se sugiere que la penetración de las muchas protuberancias tiene un efecto estimulador semejante al de un adyuvante. Se opina que la respuesta de “penetración” desde las muchas protuberancias es más que una simple respuesta inflamatoria aguda. Estos efectos de “penetración” pueden causar daño a una variedad de células y de arquitectura celular, ocasionando la aparición de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y de macrófagos, así como la liberación de IL1, factor de la necrosis tumoral (TNF) y otros agentes, lo que puede conducir a otras muchas respuestas inmunológicas. Los factores estimulantes solubles influyen en la proliferación de linfocitos y son centro de la respuesta inmunitaria para las vacunas. Además, estos factores influyen en la emigración y activación de células residentes que presentan antígeno incluyendo las células de Langerhan y células dendríticas. El dispositivo microabrasivo de la presente invención es valioso para promover una respuesta inmunitaria importante para una vacuna en la zona erosionada. Se piensa que las pequeñas estrías y los pequeños surcos creadas por la disposición de microprotuberancias sobre la zona erosionada, aumentan la disponibilidad del antígeno de la vacuna para interaccionar con las células que presentan antígeno en comparación con la de una vacuna aplicada por vía tópica en ausencia de abrasión o administrada usando agujas estándar.

Se opina que la disposición de microprotuberancias de la invención, aumenta varias veces el impacto estimulador inmunitario, trivial o inconsecuente, de una aguja única. El dispositivo microabrasivo facilita y potencia la inmunogenicidad de las vacunas mediante una estimulación inmunitaria semejante a la de un adyuvante.

Las propiedades primarias de barrera de la piel, incluyendo la resistencia a la distribución de fármacos, vacunas y agentes terapéuticos génicos, residen en la capa más externa de la epidermis, a la que se hace referencia como el estrato córneo. Las capas internas de la epidermis incluyen, en general, tres capas, identificadas comúnmente como el estrato granuloso, el estrato de Malpigio y el estrato germinativo. Una vez que un fármaco u otra sustancia aparece por debajo del estrato córneo, no hay esencialmente resistencia a la difusión en las capas subsiguientes de la piel ni a la absorción por las células o la absorción por el cuerpo a través de la corriente sanguínea o del drenaje linfático.

El ayudar a una sustancia a atravesar el estrato córneo puede ser un método eficaz para facilitar la absorción por el cuerpo de algunas sustancias y, en particular, algunas vacunas. La presente invención está dirigida principalmente a un dispositivo y un método para facilitar la distribución de una sustancia y, en particular, una sustancia bioactiva o un agente farmacéutico bioactivo, en el estrato córneo o a través del mismo, para obtener por el paciente una absorción más rápida de mayores cantidades de la sustancia bioactiva o del agente farmacéutico.

Preferiblemente, el dispositivo de la invención penetra, pero no perfora, el estrato córneo. La sustancia a administrar usando los métodos de esta invención puede ser aplicada a la piel antes de la abrasión, al mismo tiempo que la abrasión o después de la abrasión. Según una realización de los métodos de la invención, no obstante, ciertas sustancias o sustancias bioactivas específicas, incluyendo ácidos nucleicos, alérgenos y vacunas virales vivas, se aplican a la piel antes de la abrasión o al mismo tiempo que ésta, en vez de ser aplicadas a piel previamente sometida a abrasión. Es decir, la administración de ciertas sustancias tales como ácidos nucleicos, alérgenos y vacunas virales vivas, resulta mejorada cuando tales sustancias son sometidas a abrasión en la piel en vez de ser aplicadas pasivamente a piel que haya sido erosionada previamente. En otra realización del método de la invención, sin embargo, determinadas sustancias o sustancias bioactivas específicas, incluyendo partículas tales como virus y proteínas con agrupación de subunidades, son mejoradas cuando tales sustancias se aplican a piel que ha sido sometida previamente a abrasión. En otras realizaciones del método de la invención, no obstante, ciertas sustancias o sustancias bioactivas específicas, incluyendo virus totales inactivados o muertos, exhiben una eficacia similar si se aplican a la piel después de abrasión o al mismo tiempo que la abrasión.

La sustancia puede ser distribuida a la piel en cualquier forma aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En una realización, la sustancia se aplica a la piel y después se desplaza el dispositivo abrasivo o se frota con movimiento de vaivén sobre la piel y la sustancia. Se prefiere usar la mínima magnitud de abrasión para producir el resultado deseado. La determinación de la magnitud de abrasión apropiada para una sustancia seleccionada está dentro de la habilidad ordinaria en la técnica. En otra realización, la sustancia puede ser aplicada en forma seca a la superficie abrasiva del dispositivo de administración antes de la aplicación. En esta realización, un líquido reconstituyente se aplica a la piel en el sitio de distribución y el dispositivo abrasivo revestido con la sustancia es aplicado a la piel en el sitio del líquido reconstituyente. Después, el dispositivo se mueve o se frota con movimiento de vaivén sobre la piel de modo que la sustancia llega a disolverse en el líquido reconstituyente sobre la superficie de la piel, y es distribuido al mismo tiempo que la abrasión. Alternativamente, el líquido reconstituyente puede estar contenido en el dispositivo abrasivo y liberado para disolver la sustancia a medida que el dispositivo es aplicado a la piel para efectuar la abrasión. Se ha encontrado que ciertas sustancias, tales como preparaciones de ácidos nucleicos, pueden depositarse también como revestimiento sobre el dispositivo abrasivo, en forma de un gel.

Un método, que no es parte de la invención, para distribuir una sustancia en la piel de un paciente, incluye las etapas de revestir la capa externa de la piel del paciente o un dispositivo microabrasivo 2, véase la Figura 1B, con un medicamento u otra sustancia, y mover el dispositivo microabrasivo 2 de una parte a otra de la piel del paciente para proporcionar erosiones que dejan surcos suficientes para permitir la entrada de la sustancia en la epidermis viable del paciente. Debido al diseño estructural del dispositivo microabrasivo 2, el borde de ataque del dispositivo microabrasivo 2, primeramente raspa la piel del paciente y luego la parte superior del dispositivo microabrasivo 2 erosiona la capa de piel protectora externa abriendo el estrato córneo y permitiendo con ello que el medicamento u otra sustancia entre en el paciente. Después de la abrasión inicial de la capa de piel protectora externa, los bordes posterior y de ataque del

## ES 2 319 625 T3

dispositivo microabrasivo 2 pueden frotar la superficie de la zona erosionada trabajando el medicamento o la sustancia a la zona de piel erosionada mejorando con ello sus efecto medicinal.

5 Como muestran las Figuras 1B, 2A y 2B, el dispositivo microabrasivo 2, incluye la base 4 sobre la que puede montarse una superficie abrasiva 5. Alternativamente, la superficie abrasiva puede formar un todo con la base y fabricarse como una parte única con dos componentes. Preferiblemente, la base 4 es una pieza moldeada sólida. En una realización, la base 4 está configurada con la forma de una corona, parecida a un hongo, 4b, que se curva hacia arriba y está truncada en la parte superior. La parte superior de la base 4 es, generalmente, plana estando montada sobre ella o formando un todo con ella, la sustancia abrasiva 5. Alternativamente, la parte superior truncada puede tener un hueco para recibir la superficie abrasiva 5. En todas las realizaciones, la superficie abrasiva 5 incluye una plataforma con una disposición de microprotuberancias que se extienden por encima de la parte superior truncada. En otra realización del dispositivo microabrasivo, el mango, la base y la superficie abrasiva pueden formar un todo, unos con otros, y fabricarse como un dispositivo único con tres componentes.

15 El dispositivo microabrasivo se aplica a un sujeto moviendo el dispositivo microabrasivo 2 a lo largo de la piel del sujeto con la presión suficiente para permitir que la superficie abrasiva 5 abra la piel protectora externa o estrato córneo del sujeto. La presión interna aplicada a la base hace que el dispositivo microabrasivo 2 sea presionada en la piel del sujeto. Por consiguiente, es preferible que la altura de la corona semejante a un hongo, en pendiente, 4b, sea suficiente para evitar que la sustancia aplicada fluya sobre y en la faceta 4c cuando el dispositivo microabrasivo 2 está siendo utilizado. Como se describe más adelante, la superficie abrasiva 5 comprende una disposición de microprotuberancias.

20 Un mango, 6, está unido a la base 4 o puede formar un todo con la base 4. Como muestra la Fig. 2 A, el extremo superior 6a del mango puede ajustarse por acoplamiento rápido o bien por acoplamiento por fricción entre la pared lateral interior circunferencial 4a de la base 4. Alternativamente, como muestran las Figuras 1A y 2A, el mango 6 puede estar adherido (por ejemplo, mediante una resina epoxídica) al lado inferior 4c de la base 4. Alternativamente, el mango y la base pueden fabricarse juntos (por ejemplo, mediante moldeo por inyección) como una parte única de dos componentes. El mango puede tener un diámetro menor que el diámetro de la base o puede tener un diámetro similar al de la base. El lado inferior 4c de la base 4 puede estar nivelado con la corona de forma semejante a la de un hongo 4b o extenderse fuera de la corona semejante a un hongo. El extremo inferior 6b del mango 6 puede ser más ancho que el eje 6c del mango 6 o puede tener un diámetro similar al del eje. El extremo inferior 6b puede incluir una impresión 6d que sirve de descanso del dedo pulgar de la persona que administra la sustancia y que mueve el dispositivo microabrasivo 2. Además, protuberancias 8 están formadas sobre el lado exterior del mango 6 para ayudar al usuario a agarrar firmemente el mango 6 cuando se mueve el mismo contra o de una parte a otra de la piel del paciente.

35 Como indica la sección transversal de la Figura 1B en la Figura 2B, el extremo inferior 6b puede ser cilíndrico. El dispositivo microabrasivo 2 puede estar hecho de un material transparente, como indica la Figura 2A. Impresiones 6d están situadas sobre ambos lados del extremo inferior cilíndrico 6b para ayudar a la persona que emplea el dispositivo microabrasivo 2 a sujetar el mismo. Es decir, el movimiento del dispositivo microabrasivo 2 puede proporcionarse a mano o con los dedos. El mango 6 así como la base 4 del dispositivo microabrasivo está moldeada, preferiblemente, con plástico o un material semejante. El dispositivo microabrasivo 2 se fabrica, preferiblemente, de modo que es barato por lo que el dispositivo microabrasivo entero y la superficie abrasiva pueden desecharse después de su uso en un paciente.

45 La superficie abrasiva 5 está diseñada para que cuando el dispositivo microabrasivo 2 se mueve de un lado a otro de la piel del paciente, las abrasiones resultantes penetran el estrato córneo. La superficie abrasiva 5 puede estar revestida con un medicamento o una sustancia deseada para administrar a la epidermis viable del paciente.

50 Con objeto de conseguir las abrasiones deseadas, el dispositivo microabrasivo 2 debe ser movido a un lado y otro de la piel del paciente por lo menos una vez. La piel del paciente puede ser sometida a abrasión en direcciones alternas. El diseño estructural del dispositivo microabrasivo según la invención, permite que el medicamento o sustancia se absorba más eficazmente permitiendo con ello que haya de aplicarse menor cantidad del medicamento o sustancia a la piel del paciente o para revestir la superficie abrasiva 5.

55 La superficie abrasiva 5 puede revestirse con una sustancia que se desee administrar al paciente. En una realización, la sustancia puede ser un polvo colocado sobre la superficie abrasiva 5. En otra realización, la sustancia que ha de distribuirse puede ser aplicada directamente a la piel del paciente antes de la aplicación y del movimiento del dispositivo microabrasivo 2 sobre la piel del paciente.

60 Con referencia a la Figura 3, el dispositivo microabrasivo 10 de la invención, incluye un cuerpo o soporte 12 de la superficie abrasiva, sustancialmente plano, que posee una pluralidad de microprotuberancias 14 que se extienden desde la superficie del fondo del soporte. El soporte tiene, en general, un grosor suficiente para permitir fijar la superficie a la base del dispositivo microabrasivo permitiendo con ello que el dispositivo sea manejado fácilmente como muestran las Figuras 1B, 2A y 2B. Alternativamente, un mango o dispositivo de agarre diferente puede fijarse o formar un todo con la superficie superior del soporte 12 de la superficie abrasiva. Las dimensiones del soporte 12 de la superficie abrasiva, pueden variar, dependiendo de la longitud de las microprotuberancias, del número de microprotuberancias existentes en una zona dada y de la cantidad de la sustancia que ha de administrarse al paciente. Típicamente, el soporte 12 de la superficie abrasiva posee una superficie de 1 a 4 cm<sup>2</sup> aproximadamente. En realizaciones preferidas, el soporte 12 de la superficie abrasiva tiene una superficie de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente.

## ES 2 319 625 T3

Como muestran las Figuras 3, 4, 4A y 5, las microprotuberancias 14 se proyectan desde la superficie del soporte 12 de la superficie abrasiva, y son sustancialmente perpendiculares al plano del soporte 12 de la superficie abrasiva. Las microprotuberancias de la realización ilustrada están dispuestas en una pluralidad de filas y columnas y están espaciadas, preferiblemente, una distancia uniforme. Las microprotuberancias 14 poseen, en general, una forma piramidal con lados 16 que se extienden hasta la punta 18. Los lados 16 tal como se muestra, poseen un perfil cóncavo, en general, cuando se observan en corte transversal y forman una superficie curva que se extiende desde el soporte 12 de la superficie abrasiva hasta la punta 18. En la realización ilustrada, las microprotuberancias están formadas por cuatro lados, 16, sustancialmente de la misma forma y dimensión. Como indican las Figuras 4A y 5, cada uno de los lados 16 de las microprotuberancias 14 poseen bordes laterales opuestos contiguos con un lado adyacente y forman un borde raspador 22 que se extiende hacia fuera desde el soporte 12 de la superficie abrasiva. Los bordes raspadores 22 definen una superficie de raspado generalmente triangular o trapezoidal que corresponde a la forma del lado 16. En otras realizaciones, las microprotuberancias 14 pueden estar formadas con menos o más lados.

Las microprotuberancias 14 terminan, preferiblemente, en puntas romas 18. En general, la punta 18 es sustancialmente plana y paralela al soporte 14. Cuando las puntas son planas, la longitud total de las microprotuberancias no penetra la piel; por tanto, la longitud de las microprotuberancias es mayor que la profundidad total a la que dichos microprotuberancias penetran en dicha piel. La punta 18 forma preferiblemente un borde afilado, bien definido, 20, donde se encuentra con los lados 16. El borde 20 se extiende en una dirección sustancialmente paralela al soporte 12 de la superficie abrasiva y define un borde raspador más. En otras realizaciones, el borde 20 puede estar ligeramente redondeado formando una transición suave desde los lados 16 hasta la punta 18. Preferiblemente, las microprotuberancias tienen forma troncocónica o de tronco de pirámide.

El dispositivo microabrasivo 10 y las microprotuberancias pueden estar hechos de un material plástico no reactivo con la sustancia que se está administrando. Una lista no inclusiva de materiales plásticos adecuados incluye, por ejemplo, polietileno, polipropileno, poliamidas, poliestirenos, poliésteres y policarbonatos, conocidos en la técnica. Alternativamente, las microprotuberancias pueden estar hechas con un metal tal como acero inoxidable, acero al wolframio, aleaciones de níquel, molibdeno, cromo, cobalto, titanio y sus aleaciones u otros materiales tales como silicio, materiales cerámicos y polímeros vítreos. Las microprotuberancias metálicas pueden ser fabricadas usando diversas técnicas de modo semejante al del ataque fotolitográfico de una plaqueta de silicio, o micromaquinado usando un torno con punta de diamante, como se conoce en la técnica. Las microprotuberancias pueden fabricarse también mediante ataque fotolitográfico de una plaqueta de silicio, usando técnicas estándar como se conoce en la técnica. También pueden fabricarse de plástico mediante un proceso de moldeo por inyección, según se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. No. 10/193.317, presentada el 12 de Julio de 2002, que se incorpora en esta memoria por referencia.

La longitud y el grosor de las microprotuberancias se seleccionan basándose en la sustancia particular que ha de administrarse y el espesor del estrato córneo en la ubicación en que haya de aplicarse el dispositivo. Preferiblemente, las microprotuberancias penetran en el estrato córneo sustancialmente sin perforarlo o pasan a través del estrato córneo. Las microprotuberancias pueden tener una longitud de hasta 500 micrómetros. Las microprotuberancias adecuadas tienen una longitud de aproximadamente 50 a 500 micrómetros. Preferiblemente, las microprotuberancias tienen una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 micrómetros, y más preferiblemente, están en el intervalo de aproximadamente 150 a 250 micrómetros, siendo lo más preferido 180 a 220 micrómetros. Las microprotuberancias en la realización ilustrada tienen una forma generalmente piramidal y son perpendiculares con respecto al plano del dispositivo. Estas formas poseen ventajas particulares asegurando que la abrasión tiene lugar a la profundidad deseada. En realizaciones preferidas, las microprotuberancias son miembros sólidos. En realizaciones alternativas, las microprotuberancias pueden estar huecas.

Como muestran las Figuras 2 y 5, las microprotuberancias están espaciadas, preferiblemente, de un modo uniforme en filas y columnas formando una disposición para ponerse en contacto con la piel y penetrar en el estrato córneo durante la abrasión. La separación entre las microprotuberancias puede variarse dependiendo de la sustancia que haya de administrarse o bien sobre la superficie de la piel o dentro del tejido de la piel. Típicamente las filas de las microprotuberancias están espaciadas de modo que proporcionen una densidad de aproximadamente 2 a 10 por milímetro (mm). En general, las filas o columnas están espaciadas una distancia sustancialmente igual a la separación de las microprotuberancias en la disposición, proporcionando una densidad de microprotuberancias de aproximadamente 4 a aproximadamente 100 microprotuberancias por  $\text{mm}^2$ . En otra realización, las microprotuberancias pueden estar dispuestas según un esquema circular. Todavía en otra realización, las microprotuberancias pueden estar dispuestas en un esquema al azar. Cuando están dispuestas en columnas y filas, la distancia entre los centros de las microprotuberancias es, preferiblemente, al menos doble de la longitud de las microprotuberancias. En una realización preferida, la distancia entre los centros de las microprotuberancias es doble de la longitud de las microprotuberancias  $\pm 10$  micrómetros. También están incluidas separaciones más anchas hasta 3, 4, 5 y múltiplos mayores de la longitud de las microprotuberancias. Además, según se ha indicado anteriormente, la configuración de las microprotuberancias puede ser tal que la altura a las microprotuberancias puede ser mayor que la profundidad en la piel a la que estas protuberancias pueden penetrar.

La superficie superior plana de las microprotuberancias de forma troncocónica o de tronco de pirámide tiene, preferiblemente, una anchura en general de 10 a 100, de preferencia 30 -70 y, lo más preferible, 35-50 micrómetros.

## ES 2 319 625 T3

El método de preparación de un sitio de distribución sobre la piel, que no es parte de la invención, coloca el dispositivo microabrasivo contra la piel 28 del paciente en la ubicación deseada. El dispositivo microabrasivo se presiona suavemente contra la piel y luego se desplaza sobre la piel o de un lado a otro de la piel. La longitud del recorrido del dispositivo microabrasivo puede variar dependiendo del tamaño deseado del sitio de administración, definido por la superficie de distribución deseada. Las dimensiones del sitio de distribución se seleccionan para conseguir el resultado deseado y pueden variar dependiendo de la sustancia y de la forma de la sustancia que se distribuye. Por ejemplo, el sitio de distribución puede cubrir una superficie grande para tratar una erupción o una enfermedad de la piel. En general, el dispositivo microabrasivo se mueve aproximadamente 2 a 15 centímetros (cm). En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microabrasivo se mueve para producir un sitio erosionado que tiene una superficie de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> a aproximadamente 300 cm<sup>2</sup>.

El dispositivo microabrasivo se eleva después desde la piel para exponer la zona erosionada y puede aplicarse a la zona erosionada un dispositivo de distribución adecuado, un parche o una formulación tópica. Alternativamente, la sustancia que ha de administrarse puede ser aplicada a la superficie de la piel o bien antes o al mismo tiempo que la abrasión.

La extensión de la abrasión del estrato córneo depende de la presión aplicada durante el movimiento y del número de repeticiones realizadas con el dispositivo microabrasivo. En una realización el dispositivo microabrasivo se eleva desde la piel después de realizar el primer pase y se vuelve a colocar en la posición de partida, sustancialmente en el mismo lugar y posición. El dispositivo microabrasivo se mueve luego una segunda vez en la misma dirección y la misma distancia. En otra realización el dispositivo microabrasivo se mueve repetidamente de un lado a otro del mismo sitio en dirección alternada sin elevar desde la piel después de realizar el primer pase. En general, se hacen dos o más pases con el dispositivo microabrasivo.

En otras realizaciones, el dispositivo microabrasivo puede ser desplazado atrás y adelante en la misma dirección solamente, de una forma semejante a la de una red, una forma circular o de alguna otra forma, durante un período de tiempo suficiente para erosionar el estrato córneo en una profundidad adecuada para potenciar la distribución de la sustancia deseada. El movimiento lineal del dispositivo microabrasivo de una parte a otra de la piel, 28, en una dirección retira algo del tejido formando surcos, 26, separados por picos, 27, en la piel, 28, que se corresponden sustancialmente con cada fila de microprotuberancias como muestra la Figura 6. Los bordes 20, 22 y la punta roma 18 de las microprotuberancias, proporcionan una acción de raspadura o abrasión separando una parte del estrato córneo formando un surco o una estría en la piel en vez de una simple acción de corte. Los bordes 20 de las puntas romas 18 de las microprotuberancias 14, raspan y separan algo del tejido en el fondo de las estrías 26 y las permite permanecer abiertas, permitiendo con ello que la sustancia entre en las estrías para su absorción por el cuerpo. Preferiblemente, las microprotuberancias 14 tienen suficiente longitud para penetrar en el estrato córneo y formar estrías, 26, que tienen la profundidad suficiente para permitir la absorción de la sustancia aplicada a la zona erosionada sin inducir dolor ni molestia innecesaria para el paciente. Preferiblemente, las estrías 26 no perforan sino que pueden extenderse a través del estrato córneo. Los bordes 22 de las microprotuberancias de forma piramidal, 14, forman bordes raspadores que se extienden desde el soporte 12 de la superficie abrasiva hasta la punta 18. Los bordes 22, adyacentes al soporte 12 de la superficie abrasiva, forman superficies raspadoras entre las microprotuberancias que raspan y erosionan los picos 27 formados por la piel entre las estrías 26. Los picos 27 formados entre las estrías en general están ligeramente erosionados.

En otras realizaciones, el dispositivo microabrasivo puede incluir un agente farmacéutico seco o liofilizado sobre el soporte o sobre o entre las microprotuberancias. El agente farmacéutico seco puede aplicarse como un revestimiento sobre las microprotuberancias o en los valles existentes entre las microprotuberancias. Durante la abrasión de la piel, el agente farmacéutico es transferido a la zona erosionada de la piel. El dispositivo microabrasivo puede permanecer en su lugar sobre el sitio de distribución erosionado, durante un período de tiempo suficiente para permitir que el agente farmacéutico atraviese el sitio de distribución erosionado en la epidermis. El dispositivo microabrasivo puede ser fijado a la piel mediante una cinta adhesiva o un parche, cubriendo el dispositivo microabrasivo. Preferiblemente, el dispositivo microabrasivo se fija al sitio de distribución erosionado preparado mediante el método anterior, donde el agente farmacéutico es administrado pasivamente sin el uso de un diluyente o un disolvente.

En otras realizaciones, un disolvente o un diluyente adecuado tal como agua destilada o solución salina, puede ser inyectado a través de una abertura del soporte para solubilizar y reconstituir el agente farmacéutico mientras el dispositivo microabrasivo está fijado al sitio de distribución. El disolvente o diluyente puede inyectarse desde una jeringuilla u otro recipiente, o estar contenido en un depósito que forma un todo con el dispositivo microabrasivo.

Preferiblemente, las microprotuberancias están uniformemente espaciadas formando una distribución y tienen una longitud y una anchura sustancialmente uniformes. En otra realización, las microprotuberancias tienen longitudes que varían para poder penetrar en la piel a diferentes profundidades. La variación de la longitud de las microprotuberancias permite que la sustancia se deposite a diferentes profundidades en la piel y pueda aumentar la eficacia de la administración.

Si el dispositivo abrasivo no incluye un depósito para contener y descargar fluidos desde el dispositivo, el líquido que contiene la sustancia o el líquido de reconstitución debe aplicarse por separado a la piel antes o después de la abrasión, por ejemplo desde una dispensador separado o una bomba separada. No obstante, los depósitos pueden formar un todo con el dispositivo abrasivo. De preferencia, el depósito está en comunicación fluida con la superficie

abrasiva del dispositivo o la piel, por ejemplo, mediante canales a través de las agujas o protuberancias, o por medio de canales que salen del depósito entre tales agujas o protuberancias, o mediante materiales porosos o adyacentes a la superficie abrasiva. En esta realización la sustancia o el líquido de reconstitución está contenido en el depósito del dispositivo abrasivo y se dispensa a la superficie de la piel antes de la abrasión, al mismo tiempo que la abrasión o después de la abrasión. El dispositivo abrasivo puede incluir también medios para regular la velocidad de distribución de la sustancia o del líquido de reconstitución, o para regular la cantidad de sustancia o de líquido de reconstitución distribuido. Como alternativa, un parche, o bien seco o bien humedecido previamente, puede aplicarse al sitio después de la abrasión para facilitar la reconstitución o intensificar la introducción o absorción de sustancias en la piel. En otra realización, el parche puede contener el medicamento y puede aplicarse a piel que haya sido tratada previamente con un dispositivo microabrasivo.

Los ácidos nucleicos para usar en los métodos de la invención pueden ser RNA o DNA. Un ácido nucleico puede estar en una forma física adecuada para administración tópica y para absorción y expresión por células. Puede estar contenido en un vector viral, liposoma, partícula, micropartícula, nanopartícula u otra formulación adecuada, como es conocido en la técnica, o puede ser distribuido como un polinucleótido libre tal como un plásmido, como es conocido en la técnica. El ácido nucleico será formula, típicamente, en una formulación farmacéuticamente aceptable tal como un fluido o un gel compatible con el ácido nucleico. Las formulaciones farmacéuticamente aceptables para usar en la invención, que incluyen formulaciones para vacunas y composiciones de alérgenos, son también bien conocidas en la técnica.

Se ha encontrado que una abrasión mínima (tan pequeña como un pase sobre la piel) es suficiente para producir una mejora en la distribución de ácidos nucleicos a las células de la piel. La magnitud de la distribución y expresión de los ácidos nucleicos continúa en aumento al aumentar el número de pasos abrasivos sobre la piel. Seis pasos abrasivos o más dieron la mejora máxima en la distribución de ácidos nucleicos en estudios experimentales en animales. Aun cuando todos los pases sobre la piel pueden llevarse a cabo en la misma dirección, es preferible alterar la dirección durante la abrasión. El protocolo de administración de vacunas de ácidos nucleicos más comúnmente utilizado hoy en día, es la inyección IM, habitualmente con potenciadores adicionales de la respuesta cuando la dosis es baja. La determinación de la dosis apropiada de la vacuna de ácidos nucleicos que ha de administrarse usando los métodos de la invención, está dentro de la aptitud ordinaria de la técnica. Sin embargo, es una ventaja de los métodos de la invención el que la administración de vacunas de ácidos nucleicos es más eficaz que la administración por vía IM, incluso sin potenciadores de la respuesta, como ponen de manifiesto los niveles de expresión génica y estimulación de una respuesta inmunitaria.

Aminoácidos, derivados de aminoácidos, péptidos y polipéptidos, en particular alérgenos, pueden ser distribuidos también por vía tópica conforme al dispositivo y métodos de la invención. Los alérgenos son distribuidos convencionalmente a la piel mediante punción intramuscular usando dispositivos similares a los del ensayo de tuberculina con puntas. No obstante, se ha encontrado experimentalmente que puede obtenerse una respuesta alérgica incrementada mediante abrasión y distribución simultáneas. Esto produce un ensayo más sensible y tiene la ventaja de que puede detectarse más fácilmente una respuesta menor o imperceptible a la de el ensayo convencional de alérgenos, usando los métodos de la invención. Por tanto, el dispositivo y los métodos de la invención dan por resultado un mejor comportamiento y menos irritación de la piel y menos eritema que los métodos que usan dispositivos a base de puntas, conocidos anteriormente en la técnica. Otros dispositivos abrasivos adecuados para la administración de vacunas, así como de otros medicamentos, incluyen los descritos en la solicitud de patente de EE.UU. No. 09/405.488, presentada el 24 de Septiembre de 1999. Se apreciará que el tamaño y la forma de la superficie del dispositivo abrasivo, y la forma y el esquema de las agujas o de las protuberancias, pueden variar según la vacuna particular u otros agentes a administrar y otros factores tales como la facilidad de aplicación y su eficacia, como será apreciado por los expertos en la técnica.

Típicamente, para administrar vacunas u otros medicamentos usando la presente invención, un practicante debe retirar el volumen apropiado de un vial herméticamente cerrado con un septo, usando una jeringuilla, y aplicar la vacuna o el medicamento a la piel antes o después de la abrasión usando el dispositivo microabrasivo. Este procedimiento resultará en un mínimo para el uso tanto de la aguja de una jeringuilla como del dispositivo microabrasivo para cada procedimiento de administración, y requiere tiempo y atención para la medida de la dosis. Por consiguiente, sería deseable proporcionar un kit que incluya el dispositivo microabrasivo o bien en combinación con la sustancia a administrar o adaptado para integrarse con ella.

Kits y conjuntos semejantes que comprenden el instrumento de administración y la composición terapéutica, son bien conocidos en la técnica. Sin embargo, la aplicación de dispositivos microabrasivos mínimamente invasivos para administrar fármacos y vacunas, presenta claramente la necesidad inmediata de ajustar el dispositivo con la formulación, para proporcionar seguridad, eficacia, economía y medios consistentes para administrar formulaciones que permitan respuestas inmunógenas u otras respuestas terapéuticas.

El kit proporcionado por la invención comprende al menos un dispositivo microabrasivo de distribución que tiene una superficie abrasiva, en el que dicha superficie abrasiva comprende microprotuberancias que se proyectan desde ella y están dispuestas según formas determinadas, y en el que dichas microprotuberancias comprenden al menos un borde raspador. El dispositivo microabrasivo de distribución contenido en el kit puede estar totalmente integrado, es decir, incluir una faceta adaptada a recibir dicha superficie abrasiva o que forma un todo con ella, una faceta fijada a un mango y un mango que forma un todo con dicha base o que puede separarse de ella. Un depósito que contiene

una vacuna u otro medicamento y medios para llevar a efecto la administración, pueden estar integrados también en el dispositivo de distribución. Alternativamente, el kit puede contener solamente partes del dispositivo microabrasivo que pueden considerarse desechables (por ejemplo, la superficie abrasiva y dosis del medicamento), con partes que pueden utilizarse de nuevo tales como el mango y la faceta que pueden suministrarse por separado. Tales kits pueden comprender, por ejemplo, varias superficies abrasivas que pueden fijarse y dosis múltiples de vacunas adecuadas para inoculaciones masivas, con mangos y facetas suministrados por separado (opcionalmente en cantidades más pequeñas). Alternativamente, el kit puede contener uno o más dispositivos microabrasivos completos “de un solo uso”, que incluyen la superficie de abrasión, faceta y mango en forma de “usar y tirar”. En una realización preferida, el kit posee también medios para contener, medir y/o administrar una dosis de una vacuna u otro medicamento. En una realización particularmente preferida, el kit contiene también una dosis efectiva de una vacuna u otro medicamento, contenida opcionalmente en un depósito que es parte integral del dispositivo de distribución o que es capaz de fijarse funcionalmente al mismo. Alternativamente, la vacuna u otro medicamento puede suministrarse en un parche que está envasado en un kit que comprende también un dispositivo abrasivo. En esta realización, el dispositivo abrasivo se usa primeramente para tratar la piel, después de lo cual se aplica el parche al sitio de la piel tratado.

En una realización particularmente preferida, el kit de la invención comprende un dispositivo microabrasivo revestido con una cantidad efectiva del medicamento o vacuna que ha de administrarse. “Una cantidad efectiva” o una “dosis efectiva” de una sustancia, se entiende que significa una cantidad que provoca en un sujeto la respuesta deseada, incluyendo, pero no limitado a ello, una respuesta inmunoestimuladora en el caso de un alérgeno o una vacuna, u otra respuesta terapéutica o de diagnóstico.

Para usar un kit tal como el considerado por la presente invención, el practicante debe romper un cierre hermético para proporcionar acceso al dispositivo microabrasivo y, opcionalmente, la vacuna o la composición inmunógena o terapéutica. La composición puede haber sido cargada previamente en un depósito contenido en el dispositivo microabrasivo o un dispositivo de aplicación separado, en cualquier forma adecuada, incluyendo aunque no limitado a ellos, un gel, pasta, aceite, emulsión, partícula, nanopartícula, micropartícula, suspensión o líquido, o estar revestida sobre el dispositivo microabrasivo en una dosificación adecuada. La composición puede estar envasada separadamente dentro del envase del kit, por ejemplo, en un depósito, vial, tubo, blíster, bolsita, parche o semejante. Uno o más de los constituyentes de la formulación puede estar liofilizado, liofilizado por pulverización o en cualquier otra forma que pueda reconstituirse. Diversos medios de reconstitución, agentes de limpieza o agentes desinfectantes, o agentes de esterilización tópicos (toallitas con alcohol, yodo) pueden proporcionarse, además, si se desea. El practicante podría aplicar entonces la formulación a la piel del paciente o bien antes o después de la etapa de abrasión, o en el caso de un dispositivo microabrasivo precargado o revestido previamente, llevar a cabo la etapa de abrasión sin aplicación del medicamento por separado.

35

#### Ejemplo 1

#### *Administración de DNA plasmídico que codifica un gen informador usando un dispositivo microabrasivo*

40

DNA plasmídico (35  $\mu$ g) que codifica luciferasa de luciérnaga, se administró a ratones BALB/c anestesiados mediante inyección IM ó inyección ID, con una aguja estándar 30 g y una jeringuilla de 1 cc, o se administró tópicamente usando un dispositivo microabrasivo que comprendía una superficie abrasiva que consistía en microproyecciones troncocónicas de silicio de 200 nm de longitud, como muestra la Figura 4. La superficie abrasiva estaba ajustada sobre el dispositivo microabrasivo, como se representa en las Figuras 1 y 2.

45

Se utilizaron dos protocolos para administrar el DNA usando el dispositivo microabrasivo:

- 1) Abrasión y administración simultánea (ABRdel): Se rasuraron ratones en el dorso caudal usando una maquinilla eléctrica, seguido de paso de una hoja de bisturí del No. 10 para retirar el pelo restante. Luego se aplicó la solución de DNA hasta un sitio de 1 cm<sup>2</sup> sobre la superficie de la piel y la superficie abrasiva del dispositivo microabrasivo se colocó en contacto con esta solución y luego el dispositivo microabrasivo se movió lateralmente en dirección alterna, seis veces, a un lado y otro de la superficie de la piel (tres pases en cada dirección) La solución de DNA se dejó secar al aire y el sitio de la piel se dejó sin cubrir hasta que se llevaron a cabo biopsias de la piel.
- 2) Pre-abrasión (preABR): Después de rasurar según se ha descrito anteriormente, se sometió a abrasión previamente un sitio de 1 cm<sup>2</sup> mediante movimiento lateral del dispositivo microabrasivo a un lado y otro de la superficie de la piel, seis veces, con dirección alterna (tres pases en cada una de dos direcciones). La solución de DNA se pulverizó luego sobre la superficie de la piel erosionada y se dejó secar al aire como anteriormente.

60

Como testigo de una posible distribución de DNA a través de los folículos pilosos o de cortes resultantes del proceso de rasurado, se rasuraron animales como anteriormente pero no fueron sometidos a abrasión con el dispositivo microabrasivo (noABR) La solución de DNA se aplicó por vía tópica a 1 cm<sup>2</sup> del sitio de piel rasurado y se dejó secar al aire.

65

En todos los grupos, se recogieron muestras de tejido 24 horas después de la administración de DNA.. Los homogeneizados de los tejidos fueron analizados para determinar la actividad de luciferasa usando un ensayo de luminiscencia. Todas las muestras fueron normalizadas por el contenido total de proteínas, según se determinó mediante el ensayo estándar de proteínas BCA. Los datos fueron expresados como Unidades Relativas de Luz (RLU) por mg de proteína total y los resultados se exponen en la Figura 7. Cada símbolo representa la respuesta de un solo ratón. Se muestran los datos acumulativos procedentes de dos experimentos separados (n = 6 para cada grupo). Los niveles de actividad del gen informador de luciferasa alcanzados según ABRdel fueron similares en magnitud a los de la inyección IM e ID a base de aguja, y significativamente mayores (p=0,02) que para la administración tópica sobre piel previamente erosionada y sin erosionar.

## Ejemplo 2

### *Correlación de la administración con el número de pases abrasivos*

Se administró DNA plasmídico de luciferasa (35 µg) mediante el protocolo ABRdel, según se ha descrito en el Ejemplo 1, pero se varió el número de pases laterales del dispositivo microabrasivo a un lado y otro de la superficie de la piel (12, 10, 6, 4 y 2 veces). Además, después de colocar la solución de DNA sobre la superficie de la piel rasurada pero sin someter a abrasión, la superficie abrasiva del dispositivo microabrasivo fue presionada repetidamente contra la piel (seis veces) para simular la administración por medio de punción. Se incluyó aplicación tópica de la solución de DNA en ausencia de abrasión (noABR) como testigo para una posible distribución de DNA a través de los folículos pilosos o de los cortes. Se recogieron biopsias de la piel (1 cm<sup>2</sup>) 24 horas después de la aplicación, y se ensayaron para determinar la actividad de luciferasa como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Los resultados obtenidos están ilustrados en la Figura 8. Cada símbolo representa la respuesta de un solo ratón, y n = 3 para todos los grupos excepto para "x12" y "x6" en los que n = 5. Se alcanzaron niveles crecientes de expresión génica con el aumento del número de pases del dispositivo microabrasivo de una parte a otra de la superficie de la piel. Los niveles medios de expresión variaron desde más de 1000- a 2800 veces por encima de los de los testigos noABR en los grupos tratados por seis o más abrasiones. Las respuestas medias después de 4, 2 ó 1 pases del dispositivo microabrasivo de una parte a otra de la superficie de la piel, fueron aproximadamente, 300-, 200- y 30- veces por encima del ruido de fondo, respectivamente. Los niveles medios de expresión en el grupo "pinchado" fueron solamente el doble de los del ruido de fondo y no eran significativamente diferentes de los de los testigos noABR.

Estos resultados obtenidos demuestran que el proceso de abrasión es un componente crítico de la administración tópica de DNA en la piel. Se obtuvieron niveles aumentados de expresión génica al aumentar el número de pasadas abrasivas del dispositivo microabrasivo, aun cuando se observó expresión génica incluso después de un solo pase. Además, el frotamiento o abrasión de modo lateral de la piel aumentó significativamente la distribución de ácidos nucleicos y la expresión génica comparado con la compresión repetitiva del dispositivo microabrasivo contra la piel sin abrasión lateral.

## Ejemplo 3

### *Formulación de DNA plasmídico*

Se administró plásmido de luciferasa (35 µg) como una formulación líquida mediante inyección ID o por abrasión y administración simultáneas ("ABRdel líquido") con seis pases del dispositivo microabrasivo de una parte a otra de la superficie de la piel, según se ha descrito en el Ejemplo 1. Además, el DNA se liofilizó obteniendo un polvo que se depositó como revestimiento sobre la superficie de la superficie abrasiva del dispositivo microabrasivo, y se administró mediante abrasión y administración simultáneas o bien directamente como un polvo ("ABRdel polvo") o después de reconstituir con el tampón PBS en el momento de aplicar ("ABRdel polvo/recon"). La reconstitución se consiguió colocando la superficie abrasiva revestida con el polvo, en contacto directo con una gotita de PBS sobre la superficie de la piel, seguido de abrasión y administración simultáneas. Las superficies abrasivas de los dispositivos microabrasivos fueron revestidas también con DNA disuelto en gel de agarosa al 0,5% y se administró mediante abrasión y distribución simultáneas según se ha descrito anteriormente ("ABRdel gel"). Se incluyó como testigo una aplicación tópica de la formulación líquida en ausencia de abrasión (noABR). Se recogieron biopsias de la piel (1 cm<sup>2</sup>) 24 horas después de la aplicación, y se analizaron según se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se exponen en la Figura 9. Cada símbolo representa la respuesta de un solo ratón. Se indican los datos acumulativos procedentes de dos experimentos separados en los que n = 6 para cada grupo.. Se observaron niveles similares de expresión de luciferasa en la piel (aproximadamente 20 - 30 veces por encima del de noABR) para los grupos de inyección ID, ABRdel líquido y ABRdel polvo/recon. Aun cuando ni la administración directa del gel ni la del DNA revestido con polvo sin reconstitución dieron por resultado una expresión génica superior estadísticamente a la del testigo noABR, las respuestas que siguen a la administración directa a base de gel fueron, aproximadamente, 2-10 veces superiores a las de la respuesta media del testigo. Estos resultados demuestran que la reconstitución de una forma seca de la vacuna en el momento de la abrasión y la administración simultáneas, produce resultados comparables a los de la abrasión y administración simultáneas de una formulación líquida. Esto tiene ventajas para la aplicación comercial de los métodos, dado que un dispositivo abrasivo con un depósito lleno de líquido podría revestirse con el polvo de la vacuna para reconstituir la vacuna a medida que se aplica por abrasión.

## Ejemplo 4

*Respuesta de anticuerpo después de administración de vacuna de DNA para la hepatitis B por medio de un dispositivo microabrasivo*

DNA plasmídico que codifica el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), fue administrado a ratones BALB/c anestesiados mediante inyección IM o ID con una aguja estándar 30 g y una jeringuilla de 1 cc, o se administró usando un dispositivo microabrasivo según se ha descrito en el Ejemplo 1. conforme al protocolo ABRdel del Ejemplo 1. Los ratones recibieron un total de tres inmunizaciones de 100 µg por dosis. Se analizaron muestras de suero mediante el ensayo ELISA de anticuerpos para HBsAg (Ig total) 2-3 semanas después de cada inmunización. Se aplicó DNA por vía tópica a piel rasurada pero sin someter a abrasión (noABR) como testigo de posible distribución a través de cortes o de los folículos pilosos. Los datos representan el título de anti-HBsAg, definido como la dilución máxima de una muestra de suero que proporciona valores de absorbancia por lo menos tres veces por encima de los valores de fondo (suero obtenido de ratones naturales, sin inmunizar).

Se analizó un total de diez ratones por grupo. Los títulos medios están representados como barras en la Figura 10, indicándose las respuestas de ratones individuales como símbolos abiertos. Los resultados indican que la administración de vacunas de DNA usando el dispositivo microabrasivo según el protocolo ABRdel induce, *in vivo*, fuertes respuestas del anticuerpo sérico. La magnitud de tales respuestas fue significativamente mayor ( $p < 0,05$  después de las inmunizaciones 2 y 3) que las inducidas por medio de inyecciones o bien IM (la norma actual para la administración de vacunas a base de DNA) o bien ID. Además, las respuestas del grupo ABRdel fueron considerablemente menos variables que las observadas después de las dos vías de administración de inyección a base de aguja. Los títulos medios después de tres inmunizaciones fueron 12.160 para el grupo ABRdel, en comparación con 820 después de administración IM, y 4800 por medio de inyección ID. Notablemente, el enfoque ABRdel fue la vía de distribución más eficaz después de dos inmunizaciones.; el 100% (10/10) de los animales tratados mediante ABRdes estaban seroconvertidos después de dos inmunizaciones, en comparación con el 40% (4/10) por medio de la vía IM y el 50% (5/10) mediante inyección ID. Ninguno de los animales a los que se había administrado DNA plasmídico por vía tópica en ausencia de abrasión, expuso una respuesta de anticuerpo detectable. La caracterización posterior de los isotipos del anticuerpo reveló que la administración de vacunas de DNA usando el dispositivo microabrasivo según el protocolo ABRdel, induce una respuesta mixta similar a las de las inyecciones estándar IM e ID a base de aguja, que consiste en IgG1 e IgG2a, ambas. Estos resultados están en contraste con los de las vacunaciones epidérmicas descritos usando la pistola génica, en que las respuestas del anticuerpo consistían, exclusivamente, en IgG1 en ausencia de IgG2a (por ejemplo, véase la publicación de McCluskie MJ. *et al.*, Molecular Medicine 5:287, 1999). Además, la administración de DNA plasmídico por medio de dispositivos microabrasivos indujo una respuesta inmunitaria celular potente, según se midió por estimulación de células T citotóxicas específicas de antígeno.

## Ejemplo 5

*Administración de alérgenos por medio de un dispositivo microabrasivo*

Se administró dihidrocloruro de histamina (2,5 mg) a la piel de cerdos anestesiados, mediante abrasión y distribución simultáneas, usando un dispositivo microabrasivo, según se ha descrito en el Ejemplo 1 (ABRdel; 4 pases del dispositivo por la superficie de la piel). La histamina fue formulada o bien como un líquido o bien como un polvo liofilizado, que se depositó como revestimiento sobre la superficie de la superficie abrasiva y se reconstituyó directamente con agua sobre la piel en el momento de realizar la aplicación. Para comparar, la solución de histamina se colocó en forma de una gotita sobre la superficie de la piel, inmediatamente después de que un dispositivo semejante a una punta fuera colocado en contacto con la solución y se usara para pinchar la piel. Este dispositivo semejante a una punta consistía en siete agujas metálicas 34 g de 1 mm de longitud, similar a los dispositivos de que se dispone en el comercio usados para el ensayo de alérgenos. Sitios de piel adyacentes fueron tratados con el dispositivo microabrasivo o el dispositivo de punción semejante a una punta, en ausencia de histamina, con objeto de monitorizar las reacciones de la piel debidas a los dispositivos en vez de a los efectos de la histamina. Los testigos adicionales incluían sitios de la piel tratados con histamina por vía tópica en ausencia de abrasión o de punción. Los sitios de la piel fueron verificados para determinar reacciones inflamatorias inmediatas incluyendo enrojecimiento, hinchazón y la aparición de cardenales y derrames.

Se observaron reacciones inflamatorias vigorosas en los sitios de la piel tratados con histamina por medio del dispositivo microabrasivo. Se observó eritema e hinchazón importantes (hasta 2 mm de tejido levantado) a todo lo largo de la zona entera de la piel tratada con histamina, mientras que los sitios tratados con el dispositivo en ausencia de histamina mostraban solamente un enrojecimiento débil a lo largo del recorrido de abrasión, en ausencia completa de hinchazón. Reacciones de intensidad similar fueron observadas con ambas formulaciones de histamina, líquida y de polvo reconstituido. Los sitios de piel tratados con la solución de histamina usando el dispositivo de punción semejante a una punta, exhibían eritema e hinchazón importantes, aun cuando la respuesta estaba localizada a los puntos de contacto de las puntas y la zona circundante inmediata. Los sitios de la piel tratados por vía tópica con la solución de histamina en ausencia de abrasión o punción, no estaban inflamados y no podían distinguirse de la piel normal, sin tratar.

El dihidrocloruro de histamina se usa en la técnica como un sistema modélico de evaluación de alérgenos peptídicos y polipeptídicos. Estos resultados indican que el protocolo descrito de abrasión y distribución simultáneas, puede

utilizarse eficazmente para la administración tópica de alérgenos que son aminoácidos o derivados de aminoácidos, y predicen resultados similares para la administración de alérgenos de tipo peptídico o polipeptídico. Los beneficios de la distribución de alérgenos por microabrasión en comparación con la punción de la piel incluyen la distribución de la sustancia a una superficie de la piel más amplia, aumentando por tanto, con ello el sitio que genera reacción en comparación con la distribución localizada conseguida usando punción con dispositivos semejantes a los de una punta. La zona de distribución aumentada, combinada con un mejor objetivo del tejido epidérmico estimulador altamente inmunitario, puede aumentar la sensibilidad del ensayo de alérgenos en comparación con los métodos de ensayo actuales de punción de la piel a base de puntas. Además, considerando como objetivo el tejido epidérmico poco profundo por encima de los lechos capilares y de la red de nervios periféricos, la administración según la invención actual es, probablemente, menos invasiva y más segura que los métodos de ensayo actuales.

#### Ejemplo 5B

Con objeto de ilustrar las diferencias entre la presente invención y lo que se conocía con anterioridad en la técnica (Patente de EE.UU. No. 3.289.670) se llevaron a cabo diversos experimentos. En un primer conjunto de experimentos (Grupo A), DNA plasmídico que codifica el gen informador luciferasa de luciérnaga se administró a ratas Brown-Norway mediante varios métodos y se anotaron los resultados. Los resultados de los experimentos del Grupo A muestran que el uso de la presente invención proporciona una mejora inesperada de la expresión genética sobre la de otros métodos. En un segundo conjunto de experimentos (Grupo B), se administró difosfato de histamina a varias cerdas Yorkshire recientemente destetadas y se anotaron los resultados. Los resultados de los experimentos del Grupo B muestran que el uso de la presente invención proporciona una mejora inesperada de la respuesta alérgica sobre la de otros métodos.

#### Experimentos del Grupo A

En cada uno de los experimentos de este grupo, 20  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico que codifica el gen informador, luciferasa de luciérnaga, se administró en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$  a ratas Brown-Norway. Se usó una aguja de calibre 30 con una jeringuilla de 1 cc, según la técnica de inyección de estilo Mantoux, en el que la aguja se inserta en paralelo con la superficie de la piel para administrar la inyección por vía intradérmica.

En el Grupo 2A, se usó un dispositivo microabrasivo, según se describe en el Ejemplo 1, excepto que la superficie abrasiva de silicio se substituyó por una superficie abrasiva de plástico, empleándolo según el protocolo ABRdel. La solución de DNA se aplicó primeramente en forma de gotitas a la piel rasurada de las ratas. El dispositivo microabrasivo se situó luego sobre la solución de DNA y la piel. Después de ello, el dispositivo microabrasivo se usó para, simultáneamente, erosionar la piel y administrar el DNA a la piel. Para erosionar la piel, el dispositivo microabrasivo se movió lateralmente sobre la piel 4 veces (2 veces cada una en direcciones alternas) de una parte a otra de una zona de aproximadamente 1-1,5  $\text{cm}^2$ . Se recogió para su análisis 1  $\text{cm}^2$  del centro del tratamiento.

En los Grupos 3A, 4A y 5A, se usó un dispositivo de punta (Greer Laboratories, Lenoir, NC, número de catálogo GP-1) que consistía en una agrupación de 6 elementos picudos sustancialmente idénticos, dispuestos en un círculo de 0,19 cm de diámetro aproximadamente, según las enseñanzas de la patente de EE.UU. No. 3.289.670. El dispositivo se cargó con la solución de DNA plasmídico mojando las puntas en una gotita de 10  $\mu\text{l}$  de la solución, lo que suspendió esencialmente toda la solución entre el agrupamiento de elementos picudos (puntas) por acción de capilaridad.

En el Grupo 3A, el dispositivo de punta se comprimió contra la piel y se raspó de una parte a otra una zona de 0,06  $\text{cm}^2$  aproximadamente teniendo cuidado de no insertar las puntas tan profundas que hicieran sangre. El dispositivo se movió por una longitud de 0,3175 cm proporcionando un raspado con una superficie de 0,06  $\text{cm}^2$  aproximadamente.

En el Grupo 4A, el dispositivo de punta se comprimió contra la piel y se desplazó de una parte a otra de una zona de 1  $\text{cm}^2$  aproximadamente, teniendo cuidado de no insertar las puntas de modo que hicieran sangre. El dispositivo se movió de nuevo por una longitud de 1 cm. Luego se retiró el dispositivo desde la piel y se apretó contra la piel adyacente al sitio primitivo de tratamiento. El dispositivo se movió de nuevo por una longitud de 1 cm. Este proceso se repitió hasta tratar completamente una zona de piel de 1  $\text{cm}^2$ .

En el Grupo 5A, el dispositivo de punta se apretó contra la piel teniendo cuidado de no insertar las puntas tan profundas que hicieran sangre. El dispositivo no se usó para raspar la piel; en vez de ello, el dispositivo se retiró de la piel inmediatamente después de presionar contra la piel una vez.

En el Grupo 6A se aplicó directamente DNA plasmídico en forma de gotitas a la piel rasurada de las ratas. Usando la punta de una pipeta, la gotita fue pulverizada después uniformemente de una parte a otra de una zona de 1  $\text{cm}^2$  teniendo cuidado de no raspar ni erosionar la piel.

La zona de piel que comprendía cada uno de los sitios de distribución fue cortada 24 horas después de la administración, homogeneizada y tratada para determinar la actividad de luciferasa usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega, Madison, WI). Para tener en cuenta las diferencias entre los grupos en lo referente a la cantidad total de tejido recogido, la actividad de luciferasa fue normalizada para el contenido total de proteína de muestras de tejidos, según se determinó mediante el ensayo BCA (Pierce, Rockford, IL) y se expresó como Unidades Relativas de Luz (RLU) por mg de proteína total.

La Figura 11 expone la media de la actividad de luciferasa en muestras de piel obtenidas de las ratas tratadas usando los dispositivos y los métodos anteriormente descritos ( $n = 4$  por grupo)  $\pm$  Error Típico de la media. La actividad de luciferasa fue la más fuerte en el Grupo 1A, 10.720 RLU/mg. La administración usando el dispositivo microabrasivo (Grupo 2A) dio por resultado también una fuerte actividad de luciferasa en las muestras de piel cortadas (3.880 RLU/mg). Por el contrario, la administración usando los dispositivos de puntas dio por resultado un pequeño aumento o ningún aumento de la actividad de luciferasa en comparación con el grupo testigo de administración tópica. La actividad de luciferasa fue 237 RLU/mg al usar el dispositivo de punta para raspar una zona de 0,06 cm<sup>2</sup> aproximadamente (Grupo 2A) en comparación con 122 RLU/mg cuando se usó para raspar una zona de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente (Grupo 3A), y 61 RLU/mg cuando se presionó contra la piel sin movimiento lateral (Grupo 5A). La aplicación tópica del plásmido de DNA en ausencia de dispositivo de distribución (Grupo 6A) falló también en inducir en la piel una actividad importante de luciferasa (43 RLU/mg).

Por tanto, la administración de DNA plasmídico usando un dispositivo microabrasivo y un método de administración tal como se describe en la Solicitud, dio por resultado una actividad del gen informador a niveles hasta 32 veces mayores que los observados después de administrar usando un dispositivo de punta y el método de administración descrito en la patente de EE.UU. No. 3.289.670. Además, la administración usando el dispositivo microabrasivo de la presente invención, da por resultado una actividad del gen informador a niveles hasta 90 veces mayores que los observados después de administrar usando un dispositivo de punta tal como se describe en la patente de EE.UU. No. 3.289.670 y presionando contra la piel o después de aplicación tópica sin ayuda. Además de lo anterior, la inspección visual después de la administración de la sustancia mediante el método y el dispositivo descritos en los Grupos 3A-5A (dispositivo de punta) reveló que una cantidad importante de sustancia permanecía suspendida entre el grupo de puntas, mientras que, por el contrario, el método y el dispositivo del Grupo 2A mostró retener menos sustancia.

#### Experimentos del Grupo B

En cada uno de los experimentos de este grupo, se administró a cerdas Yorkshire de reciente destete 10  $\mu$ l de una solución de difosfato de histamina (Sigma, St. Louis, MO) de 276 mg/ml (100 mg/ml de histamina).

En el Grupo 1B, se usó un dispositivo microabrasivo según se ha descrito con respecto al experimento del Grupo A. La solución de histamina se aplicó primeramente en forma de gotita a la piel rasurada de los cerdos. El dispositivo microabrasivo se situó después sobre la solución de histamina y la piel y se utilizó para erosionar simultáneamente la piel y distribuir la histamina en la piel. Para erosionar la piel, el dispositivo microabrasivo se movió lateralmente sobre la piel 6 veces (3 veces cada una en direcciones alternas) de una parte a otra de una zona de 1-1,5 cm<sup>2</sup> aproximadamente.

En el Grupo 2B, se usó un dispositivo de punta como el descrito en relación con los experimentos de los Grupos 3A-5A. El dispositivo se cargó con la solución de histamina mojando las puntas en una gotita de 10  $\mu$ l de la solución, lo que esencialmente suspendió toda la solución entre el agrupamiento de puntas por acción capilar. Usando una ligera presión, el dispositivo cargado se comprimió después contra la piel rasurada, teniendo cuidado de no insertar las puntas tan profundas que hicieran sangre. El dispositivo se movió después en una longitud de 0,3175 cm proporcionando un raspado con una superficie de 0,06 cm<sup>2</sup> aproximadamente.

En el Grupo 3B se usó un dispositivo de punta según se ha descrito con respecto a los experimentos de los Grupos 3A - 5A. El dispositivo de punta se presionó contra la piel rasurada y se movió por una zona de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente teniendo cuidado de no insertar las puntas tan profundas que hicieran sangre. El dispositivo se movió en una longitud de 1 cm. Después, el dispositivo se separó de la piel y se presionó contra la piel adyacente al sitio primitivo de tratamiento. El dispositivo se movió de nuevo en una longitud de 1 cm. Este proceso se repitió hasta tratar completamente una zona de 1 cm<sup>2</sup>.

En el Grupo 4B se usó un dispositivo de punta según se ha descrito en relación con los experimentos de los Grupos 3A - 5A. El dispositivo de punta se presionó contra la piel teniendo cuidado de no insertar las puntas tan profundas que hicieran sangre. El dispositivo no se usó para raspar la piel; en vez de ello, el dispositivo se retiró de la piel inmediatamente después de presionar contra la piel una vez.

Se llevaron a cabo experimentos testigo usando los métodos anteriormente descritos, excepto que sin la aplicación de la solución de histamina.

Se observaron sitios de la piel para detectar enrojecimiento o hinchazón 20 minutos después del tratamiento. Los sitios de piel hinchados fueron medidos vertical y horizontalmente en los puntos más largo y más ancho de la reacción usando calibres digitales. Aun cuando los sitios de reacción no tenían unas características geométricas uniformes, se hizo una estimación de la superficie multiplicando las medidas verticales y horizontales. La Figura 12 expone fotos de reacciones de la piel. Los resultados indican que la aplicación de la solución de histamina con el dispositivo microabrasivo de la presente invención (Grupo 1B) da por resultado una superficie de la hinchazón inducida por la histamina mayor que la de las reacciones correspondientes inducidas por el dispositivo de punta descrito en la patente de EE.UU. No. 3.289.670 (Grupos 2B-4B). Notablemente, si bien la distribución de histamina con el dispositivo microabrasivo dio por resultado reacciones importantes en la piel, los sitios testigo tratados con el dispositivo solo estaban completamente claros a los 20 minutos y no mostraban evidencia de hinchazón ni de enrojecimiento. Por el contrario, los dispositivos de puntas aplicados a la piel, sin histamina, dieron por resultado una hinchazón y un enrojecimiento considerables, haciendo difícil distinguir los efectos del dispositivo solo, de los

efectos de la histamina. La Figura 13 expone la superficie relativa de hinchazón del tejido para cada grupo, obtenida después de restar las medidas de hinchazón observadas del uso del dispositivo solamente sin histamina. Los resultados indican que la superficie media de la hinchazón inducida por la histamina es hasta 4 veces mayor cuando se administró usando el dispositivo microabrasivo de la presente invención (Grupo 1B) en comparación con el dispositivo de punta de la patente de EE.UU. No. 3.289.670 (Grupos 2B-4B). Además de lo anterior, la inspección visual después de administrar la sustancia por medio del método y del dispositivo descrito (Grupo 2B-4B) (dispositivo de punta), reveló que una cantidad apreciable de sustancia permanecía suspendida entre los agrupamientos de puntas. Por el contrario, el método y el dispositivo del Grupo 1B mostró que retenía apreciablemente menos cantidad de la sustancia.

#### Ejemplo 6

##### *Dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de plástico*

La técnica anterior describe métodos basados en Sistemas Mecánicos Micro-Electrónicos (MEMS) para fabricar superficies abrasivas de silicio, precisas desde el punto de vista estructural. Los dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de materiales plásticos poseen varias ventajas sobre los dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de silicio, que incluyen facilidad de fabricación, bajo costo y alta reproducibilidad. Aun cuando tales superficies abrasivas de plástico parecen tener características similares a las primitivas de silicio, no se sabía si podrían comportarse con la misma capacidad *in vivo*.

El ejemplo que sigue muestra la utilidad de dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de plástico.

#### Ejemplo 6a

##### *Rotura de la función de barrera de la piel*

Los 10-20  $\mu\text{m}$  exteriores de la piel, la capa de estrato córneo, representa una barrera física y química eficaz. Un estrato corneo intacto evita la absorción pasiva tópica de vacunas y otras sustancias medicamentosas en la piel y a través de la piel. Para comparar la eficacia de dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de plástico y con las de silicio para romper esta barrera de la piel, se midió la pérdida de agua trans-epidérmica (TEWL) sobre piel de rata después de tratamiento con los dispositivos microabrasivos, según se ha descrito en el Ejemplo 1.

El proceso de tratamiento consistió en hacer pasar lateralmente el dispositivo microabrasivo un número variable de veces una parte y otra de una sección rasurada del dorso caudal de animales anestesiados. Se hicieron lecturas de la TEWL antes del tratamiento y después de cada pase del dispositivo microabrasivo, usando instrumentación estándar (cyberDERM, Media, Pensilvania). Se evaluó un total de  $n = 4$  por grupo. La Figura 14 representa las medidas medias de TEWL y los errores típicos.

Los resultados demuestran que la función de barrera de la piel se interrumpe en una extensión similar usando dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de plástico y de silicio. Se observaron aumentos importantes de TEWL después de un solo pase de cada dispositivo a por la piel y que continuaban aumentando con pases adicionales. Ambos dispositivos se comportaron de idéntico modo en romper esta barrera independientemente del número de pases. Por el contrario, otros tipos de dispositivos que carecen de la micro-arquitectura encontrada en los dispositivos microabrasivos (por ejemplo, cepillos de dientes) no causaron aumento de TEWL con este número de pases (los resultados no se exponen).

Los dispositivos microabrasivos fueron ensayados también en un modelo porcino. La capa externa de la piel del cerdo, el estrato córneo, tiene, aproximadamente, un grosor 5-10  $\mu\text{m}$  mayor que la capa correspondiente de la piel de la rata. No obstante, ambas superficies abrasivas, de silicio y de plástico, eran efectivas para romper esta barrera, dando como resultado un valor de TEWL importante después de tan solo un pase del dispositivo a través de la piel y que continuó aumentando con pases adicionales (Figura 15;  $n=3$  sitios por condición sobre un cerdo aislado). Como anteriormente, se obtuvieron resultados idénticos con los 2 tipos de dispositivos.

Análisis histológicos de rotura del estrato córneo y de penetración de bolas fluorescentes en cerdos, revelaron resultados similares al comparar superficies abrasivas de silicio y de plástico. En este ejemplo se aplicó una solución de bolas fluorescentes a un sitio de la piel que había sido tratado previamente mediante 2 pases laterales del dispositivo microabrasivo. Después de aplicación tópica de la solución de las bolas, el dispositivo se limpió con alcohol, se secó, luego se colocó en contacto con la solución de las bolas sobre la superficie de la piel y se frotó a través de la piel 2 veces más. El análisis histológico de los sitios de aplicación recuperados reveló una forma y una extensión similares de rotura del estrato córneo y de distribución de las bolas después de la administración por medio de las superficies abrasivas de silicio y de plástico. Estaban presentes bolas en toda la superficie de los sitios de piel tratados y se mostraba evidencia de penetración epidérmica.

## Ejemplo 6b

*Administración y expresión de DNA plasmídico que codifica un gen informador*

DNA plasmídico que codifica un gen informador, luciferasa de luciérnaga, se administró a ratones usando dispositivos microabrasivos que comprendían superficies abrasivas de plástico o de silicio (Figura 16). El protocolo de administración se ajustó al protocolo ABRdel descrito en el Ejemplo 1. Se administró un total de 37,5  $\mu$ g de DNA plasmídico puro en un volumen de 25  $\mu$ l. Los testigos incluyeron inyección ID con aguja estándar y jeringuilla, y aplicación tópica a piel rasurada sin usar un dispositivo microabrasivo (n = 3 ratones por grupo).

Los resultados demuestran que los dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de plástico son muy eficaces para administrar DNA plasmídico, lo que se traduce en niveles importantes de expresión génica localizada en la piel (Figura 16). La actividad media de luciferasa en el grupo que había recibido DNA plasmídico por medio del dispositivo microabrasivo que comprendía una superficie abrasiva de plástico, era 140 veces mayor que la de los testigos a los que se había administrado DNA por vía tópica sin ayuda de un dispositivo microabrasivo. La administración por medio de dispositivos microabrasivos que comprendían una superficie abrasiva de silicio dio por resultado una alta expresión similar con una actividad media de aproximadamente 100 veces la de los testigos. Se observaron niveles superiores de actividad de luciferasa en ambos grupos de microabrasivos en comparación con la inyección ID a base de agujas estándar (RLU media/mg: superficie abrasiva de plástico, 43.688; superficie abrasiva de silicio, 31.034; inyección ID, 2.214; Tópica, 313).

En resumen, los resultados demuestran que los dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de plástico son, por lo menos, tan eficaces como los dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de silicio en lo referente a la distribución y expresión de DNA plasmídico. Además, los dispositivos microabrasivos son más eficaces que la aguja estándar para administrar DNA plasmídico a la piel, dando por resultado mayores niveles de expresión génica.

## Ejemplo 6c

*Administración de una vacuna de DNA*

Los datos de los resultados que se presentan en la Figura 10 fueron representados como un gráfico de líneas y presentados junto con los resultados obtenidos de un conjunto de ratones (n = 3 por grupo), inmunizados según los mismos métodos que se han descrito en el Ejemplo 1, excepto el uso de dispositivos microabrasivos que comprendían una superficie abrasiva de plástico.

Los resultados demuestran que los dispositivos microabrasivos que comprenden superficies abrasivas de plástico son tan eficaces como los que comprenden superficies abrasivas de silicio para inducir respuestas inmunitarias específicas de antígeno (Figura 17). Los títulos de anticuerpos séricos inducidos mediante ambos dispositivos microabrasivos eran más altos que los inducidos mediante inyecciones ID e IM, estándar, a base de aguja. No se observaron respuestas importantes después de aplicación tópica en ausencia de un dispositivo microabrasivo, lo que demuestra que el dispositivo y el método de la presente invención permiten la inmunización por vía tópica.

## Ejemplo 7

*Respuesta de anticuerpos después de administrar vacuna de DNA de virus de la influenza sin adyuvante añadido, por medio de un dispositivo microabrasivo*

Para investigar adicionalmente la utilidad de la administración de vacunas de DNA mediante el dispositivo y el método de la presente invención, ratas Brown-Norway fueron inmunizadas con DNA plasmídico que codifica la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza procedente de la cepa A/PR/8/34 (el plásmido fue proporcionado por la Dra. Harriet Robinson, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA). Se inmunizaron ratas (n = 3 por grupo) tres veces (los días 0, 21 y 42) con DNA plasmídico en solución de PBS (50  $\mu$ g por rata en un volumen de 50  $\mu$ l). Se administró la vacuna usando un dispositivo microabrasivo que comprendía una superficie abrasiva de plástico, según se ha descrito en el Ejemplo 6, y según el protocolo ABRdel, según se ha descrito en el Ejemplo 1. Alternativamente, la vacuna se inyectó por vía ID o IM usando agujas. Como testigo negativo, se aplicó DNA por vía tópica a piel rasurada pero sin tratar de otro modo. Se recogieron sueros a las 3, 5, 8 y 11 semanas y se analizaron mediante el ensayo ELISA para determinar la presencia de anticuerpos específicos de la influenza. Brevemente, pocillos de microtitulación (Nalge Nunc, Rochester, NY) fueron revestidos con 0,1  $\mu$ g de influenzavirus totales inactivados (A/PR/8/34; Charles River SPAFAS, North Franklin, CT) durante la noche, a 4°C. Después de bloquear durante 1 hora a 37°C en el seno de PBS más leche descremada al 5%, las placas fueron incubadas con diluciones en serie de los sueros de ensayo, durante 1 hora, a 37°C. Luego se lavaron las placas y se incubaron posteriormente con IgG anti-rata, cadena H+L, (Southern Biotech, Birmingham, AL) conjugada con peroxidasa de rábano picante, durante 30 minutos, a 37°C, y después fueron reveladas usando sustrato TMB (Sigma, St. Louis, MO). Las medidas de la absorbancia ( $A_{450}$ ) fueron realizadas en un lector de placas Tecan Sunrise™ (Tecan, RTP, NC).

Los resultados (Figura 18) demuestran que las respuestas de anticuerpos séricos inducidas después de administrar vacuna de DNA plasmídico puro mediante los dispositivos microabrasivos, son tan potentes o más potentes que las inducidas mediante inyección ID o IM.

#### Ejemplo 8

*Respuesta de anticuerpos después de administrar vacuna de DNA del virus de la influenza con adyuvante añadido, por medio de un dispositivo microabrasivo*

Para investigar adicionalmente la distribución de vacunas genéticas con adyuvante mediante el dispositivo y el método de la presente invención, se preparó el DNA plasmídico que codifica la HA de la influenza, descrito en el Ejemplo 7, usando el sistema de adyuvante de Ribi MPL + TDM (RIBI Immunochemicals, Hamilton, MT) según las instrucciones del fabricante. Ratas (n = 3 por grupo) fueron inmunizadas para determinar el anticuerpos sérico específico de la influenza según se ha descrito en el Ejemplo 7. Los resultados (Figura 19) demuestran que las respuestas de anticuerpo sérico inducidas después de la administración de vacuna de DNA plasmídico con adyuvante, por medio de los dispositivos microabrasivos son más fuertes y más rápidas que las inducidas mediante inyección ID o IM.

#### Ejemplo 9

*Respuesta de anticuerpos después de administrar vacuna del virus de la influenza “prime-boost” sin adyuvante añadido, por medio de un dispositivo microabrasivo*

Un enfoque de vacunación recientemente desarrollado para numerosas enfermedades, incluyendo el HIV, es el denominado enfoque “prime-boost” en el que las inmunizaciones primarias (“priming”) y las dosis de refuerzo (“boosters”) emplean diferentes clases de vacunas (Immunology Today, Apr 21(4):163-165, 2000). Por ejemplo, puede empezarse primeramente con una versión de DNA plasmídico de la vacuna, seguido de un refuerzo subsiguiente con una proteína subunitaria, un virus inactivado o una preparación de DNA llevada en un vector. Para investigar la distribución mediante el dispositivo y el método de la presente invención, ratas del Ejemplo 7, recibieron dosis de refuerzo en la semana 11 con influenzavirus inactivado total (Figura 20). (A/PR/8/34), 100 µg en un volumen de 50 µl de PBS). (El virus se obtuvo de Charles River SPAFAS, North Franklin, CT). Los resultados indican un efecto de refuerzo similar en todos los grupos. Por tanto, la administración de vacunas según la estrategia “prime-boost” usando dispositivos microabrasivos da por resultado la estimulación de respuestas inmunitarias a niveles que son, por lo menos, tan fuertes como las inducidos mediante inyección ID o IM.

En un experimento similar, realizado siguiendo el uso de vacunas con adyuvante, ratas del Ejemplo 8 recibieron dosis de refuerzo en la semana 11 con influenzavirus inactivado total según se ha descrito anteriormente. Los resultados (Figura 21) indican un efecto de refuerzo similar en todos los grupos.. Fue solo después de este refuerzo cuando la respuesta inmunitaria en el grupo de inyección IM era comparable a la inducida por el dispositivo microabrasivo. Por tanto, la administración de vacunas según una estrategia “prime-boost” incluyendo adyuvantes, usando dispositivos microabrasivos, da por resultado la estimulación de respuestas inmunitarias en niveles que son, por lo menos, tan fuertes como las inducidos mediante inyección ID o IM.

#### Ejemplo 10

*Respuesta de anticuerpos después de administrar vacuna de la rabia mediante un dispositivo microabrasivo*

Se inmunizaron ratas los días 0, 7 y 21 con vacuna de la rabia, 25 µl, (Aventis Imovax). La vacuna se administró usando un dispositivo microabrasivo que comprendía una superficie abrasiva de plástico, según se ha descrito en el Ejemplo 6, y siguiendo o bien el protocolo preABR o bien el protocolo ABRdel, según se ha descrito en el Ejemplo 1. Alternativamente, la vacuna se inyectó por vía ID o IM usando agujas. Como testigo negativo se aplicó DNA tópicamente a piel rasurada pero sin tratar de otro modo. Se inmunizaron ratas (n = 5 por grupo) los días 0, 7 y 21. Se recogieron sueros los días 0, 7, 21 y 35 y se analizaron para detectar la presencia de anticuerpos específicos de la rabia usando el Ensayo Rápido de Inhibición del Foco de Fluorescencia, en la Universidad de Kansas. Los resultados (Figura 22) demuestran que los títulos de anticuerpos neutralizantes de la rabia, inducidos después de la administración usando dispositivos microabrasivos, están retardados en comparación con los inducidos por inyección. Sin embargo, el día 21 y persistiendo hasta el día 35, los títulos se hicieron comparables a los conseguidos por inyección. Además, se observaron niveles similares de respuesta para ambos métodos de administración; ABRdel y preABR. La aplicación tópica de la vacuna a piel rasurada pero sin tratar de otro modo, falló en inducir una respuesta significativa. Por tanto, los dispositivos microabrasivos hacen posible la administración tópica de vacunas virales inactivadas y de formulaciones de vacunas inyectables estándar. Esto demuestra compatibilidad de los dispositivos microabrasivos con las vacunas convencionales formuladas para inyectar. Además, para una preparación de una vacuna de virus inactivado total, el método de administración con un dispositivo microabrasivo no parece tener efecto sobre la fuerza de la respuesta inmunitaria.

## Ejemplo 11a

*Respuestas de anticuerpos y de células T después de administrar vacuna del virus de la Hepatitis B mediante un dispositivo microabrasivo*

En otro experimento vacuna de la subunidad de proteína del antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) se administró a ratones BALB/c mediante las vías de administración que siguen:

- 1) Inyección intramuscular (IM) usando aguja estándar
- 2) Inyección intradérmica (ID) usando aguja estándar
- 3) Dispositivo microabrasivo según se describe en el Ejemplo 1, usado conforme al método “preABR”, como se describe en el Ejemplo 1.
- 4) Dispositivo microabrasivo según se describe en el Ejemplo 1, usado conforme al método “ABRdel”, como se describe en el Ejemplo 1
- 5) Aplicación tópica a piel rasurada, directamente (sin usar dispositivo microabrasivo; marcado “Tópica” en la Figura 23).

Todos los animales (n = 4 por grupo) recibieron 2 inmunizaciones, cada una de las cuales consistía en 10 µg de HBsAg más 10 µg de oligonucleótidos que contenían CpG como adyuvante. Las inmunizaciones se efectuaron al comienzo del experimento (“día 0”, d0) y el día 21. Los ratones fueron sangrados y se efectuó un análisis para determinar los títulos de anticuerpos séricos específicos de HBsAg mediante el ensayo ELISA los días 21, 35 y 56. Los resultados (Figura 23) demuestran que el tratamiento con el dispositivo microabrasivo hace posible la inmunización por vía tópica. Las respuestas de anticuerpos en el grupo preABR fueron significativamente mayores que las respuestas correspondientes, muy débiles, observadas en el grupo testigo de administración tópica. La magnitud de la respuesta inducida por el tratamiento preliminar con el dispositivo microabrasivo, era comparable a la observada después de inyección directa, IM o ID, con una aguja estándar. Notablemente, en contraste con los resultados obtenidos para ácidos nucleicos (Ejemplo 1), la distribución de HBsAg mediante abrasión y administración simultánea (ABRdel) provocó una respuesta más débil. Por tanto, el método más apropiado de administración usando dispositivos microabrasivos, depende, al menos en parte, del tipo de sustancia que haya de distribuirse. HBsAg representa una vacuna subunitaria que consiste en monómeros proteínicos que se auto-agrupan, en partículas tales como virus. Los resultados expuestos en el Ejemplo 11 demuestran que esta clase de vacunas se administra del mejor modo mediante tratamiento previo con el dispositivo microabrasivo, aun cuando respuestas importantes podría también ser inducidas mediante el método de “abrasión y administración simultáneas”.

## Ejemplo 11b

En otro experimento, se administró vacuna proteínica subunitaria de HBsAg, a ratones BALB/c mediante las siguientes vías de administración:

- 1) Inyección intradérmica (ID) usando aguja estándar
- 2) Dispositivo microabrasivo según se describe en el Ejemplo 1, usado según el método “preABR” como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de limitar a dos pases el número de pases del dispositivo microabrasivo por la superficie de la piel
- 3) Dispositivo microabrasivo según se describe en el Ejemplo 1, usado según el método “preABR” como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de limitar a cuatro pases el número de pases del dispositivo microabrasivo por la superficie de la piel
- 4) Dispositivo microabrasivo según se describe en el Ejemplo 1, usado según el método “preABR” como se describe en el Ejemplo 1 (6 pases por la piel).

Aplicación tópica a piel rasurada, directamente (sin usar dispositivo microabrasivo; marcado “Tópica” en la Figura 24).

Todos los animales (n = 3 por grupo) recibieron 1 inmunización con 10 µg de HBsAg más 10 µg de oligonucleótidos que contenían CpG. Diez días después de la inmunización se recogieron suspensiones celulares únicas desde los nódulos linfáticos desecados (DLN) y se volvieron a estimular en cultivo con las dosis indicadas de HBsAg. Se midió la proliferación de células T al cabo de 5 días de cultivo usando un ensayo comercial a base de MTS.

Los resultados (Figura 24) demuestran que el tratamiento preliminar con un dispositivo microabrasivo hace posible la inmunización tópica. Fuertes respuestas proliferativas de células T fueron observadas en todos los grupos tratados con el dispositivo microabrasivo, en comparación con respuestas muy pequeñas o ninguna respuesta en el grupo testigo

de administración tópica. La magnitud de la respuesta en los grupos tratados con el dispositivo microabrasivo fueron mayores en la mayor parte de las dosis que las respuestas correspondientes observadas después de inyección ID con una aguja estándar. Las respuestas más fuertes fueron observadas después de solamente 2 pases del dispositivo por la piel. Hubo un descenso menor de la actividad proliferativa después de 4 ó 6 pases. Experimentos adicionales mostraron un descenso adicional con >6 pases del dispositivo, con pérdida completa de actividad después de 10 pases (datos no expuestos). Estos resultados sugieren que existe un número óptimo de pases del dispositivo que debe ser determinado para hacer posible la inmunización tópica con una vacuna dada. Además, estos resultados sugieren que un protocolo suave de tratamiento (tan poco como 2 pases) puede, en algunos casos, ser suficiente para romper la barrera externa de la piel y permitir la inmunización tópica.

#### Ejemplo 12

*Respuesta de células T después de administrar mediante un dispositivo microabrasivo, una vacuna del melanoma propagada por un vector adenoviral*

Se ensayó un adenovirus que libera DNA que codifica gp100 (un antígeno tumoral del melanoma), usando dispositivos microabrasivos, administración tópica y administración ID, *inter alia*, en un modelo de melanoma del ratón. Los siguientes grupos experimentales fueron investigados (n = 8 por grupo):

- 1) Vehículo solo administrado mediante el protocolo "ABRdel" según se describe en el Ejemplo 1, usando dispositivos microabrasivos como se describe en el Ejemplo 1.
- 2) Vacuna propagada por un vector adenoviral (Ad2) que codifica el antígeno gp100 del melanoma, administrada mediante el protocolo "ABRdel" según se describe en el Ejemplo 1, usando dispositivos microabrasivos como se describe en el Ejemplo 1.
- 3) Vehículo solo administrado mediante el protocolo "preABR" según se describe en el Ejemplo 1, usando dispositivos microabrasivos como se describe en el Ejemplo 1.
- 4) Vacuna propagada por un vector adenoviral (Ad2) que codifica el antígeno gp100 del melanoma, administrada mediante el protocolo "preABR" según se describe en el Ejemplo 1, usando dispositivos microabrasivos como se describe en el Ejemplo 1.
- 5) Vacuna propagada por un vector adenoviral (Ad2) que codifica el antígeno gp100 del melanoma, administrada por vía tópica a piel rasurada pero sin tratar de otro modo.
- 6) Vacuna propagada por un vector adenoviral (Ad2) que codifica el antígeno gp100 del melanoma, administrada por inyección ID usando agujas convencionales.

Se administró un total de  $2 \times 10^9$  partículas de adenovirus por ratón. La respuesta inmunitaria celular específica de gp100 se midió el día 30 después de administrar la vacuna, mediante el ensayo ELISPOT de células esplénicas que producen interferón gamma. Los resultados se exponen en la Figura 25. La administración efectuada usando los dispositivos microabrasivos según el protocolo "ABRdel" (Grupo 2) produjo una respuesta importante en comparación con la administración tópica (Grupo 5), aun cuando fue algo más débil que la producida por inyección ID (Grupo 6). Notablemente, para esta vacuna propagada en vectores adenovirales, se observaron respuestas inmunitarias celulares más fuertes en el grupo "ABRdel" (Grupo 2) en comparación con las del grupo "preABR" (grupo 4). Estos resultados son similares a los observados para el DNA plasmídico (véase el Ejemplo 1). Por tanto, el método más apropiado de administración usando dispositivos microabrasivos depende, al menos en parte, del tipo de sustancia que haya de administrarse. El vector Ad2 representa un virus vivo. Los resultados indicados en el Ejemplo 13 demuestran que esta clase de vacunas se administra del mejor modo mediante abrasión y distribución simultáneas, aun cuando respuestas inmunitarias detectable podrían también ser inducidas mediante el método "preABR".

Una descripción adicional de vectores adenovirales adecuados para usar en vacunas puede encontrarse, entre otras publicaciones, en la patente de EE.UU. No. 5.882.877.

#### Ejemplo 13

*Respuesta de anticuerpos después de administrar una vacuna del ántrax, recombinante, de subunidades de proteínas, mediante un dispositivo microabrasivo*

En otro experimento se inmunizaron ratones con el antígeno protector recombinante (rPA) del *Bacillus anthracis*. El rPA fue proporcionado por el Dr. Robert Ulrich del United States Army Medical Research in Infectious Diseases (USAMRIID). Ratones BALB/c (n = 10 por grupo) fueron inmunizados con 10 µg de rPA en presencia o ausencia de adyuvantes adicionales según se detalla a continuación:

## ES 2 319 625 T3

- Grupo 1: IM-rPA más adyuvante Alhydrogel (alum)
- Grupo 2: Dispositivo microabrasivo, “preABR”-rPA (sin adyuvante)
- Grupo 3: Dispositivo microabrasivo, “preABR”-rPA más adyuvante Alhydrogel (alum)
- Grupo 4: Dispositivo microabrasivo, “preABR” -rPA más adyuvante oligonucleótido-CpG
- Grupo 5: Dispositivo microabrasivo, “ABRdel” - rPA (sin adyuvante)
- Grupo 6: Dispositivo microabrasivo, “ABRdel”-rPA más adyuvante Alhydrogel (alum)
- Grupo 7: Dispositivo microabrasivo, “ABRdel” - rPA más adyuvante oligonucleótido-CpG
- Grupo 8: Vía Tópica - rPA (sin adyuvante)
- Grupo 9: Vía Tópica - rPA más adyuvante Alhydrogel (alum)
- Grupo 10: Vía tópica - rPA más adyuvante oligonucleótido-CpG

Se inmunizaron ratones los días 0, 21 y 42. Se recogieron sueros y se analizaron mediante el ensayo ELISA para detectar anticuerpos específicos del rPA los días 21, 42 y 56. Los resultados están resumidos en las Tablas 1-3 que figuran a continuación.

TABLA 1

*Títulos de anticuerpo sérico anti-rPA el día 21 (1 dosis de vacuna del ántrax)*

Se indican los títulos de animales individuales (n=10) y la media para cada grupo.

Grupo:	1) IM	2) preABR	3) preABR	4) preABR	5) ABRdel	6) ABRdel	7) ABRdel	8) Tópica	9) Tópica	10) Tópica
Adyuvante:	alum	nada	alum	CpG	nada	alum	CpG	nada	alum	CpG
	50	50	<50	<50	50	<50	<50	50	<50	<50
	50	<50	<50	50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	50	50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	200	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	<50	200	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	100	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
Media:	10	5	35	30	5	<50	<50	5	<50	<50

# ES 2 319 625 T3

TABLA 2

*Títulos de anticuerpo sérico anti-rPA el día 42 (2 dosis de vacuna del ántrax)*

Se indican los títulos de animales individuales (n=10) y la media para cada grupo.

Grupo:	1) IM	2) preABR	3) preABR	4) preABR	5) ABRdel	6) ABRdel	7) ABRdel	8) Tópica	9) Tópica	10) Tópica
Adyuvante:	alum	nada	alum	CpG	nada	alum	CpG	nada	alum	CpG
	51200	12800	8400	6400	6400	1600	6400	400	50	50
	12800	12800	25600	25600	3200	6400	1600	<50	<50	<50
	25600	12800	25600	12800	400	3200	3200	<50	<50	<50
	3200	12800	6400	6400	6400	6400	3200	<50	<50	<50
	6400	6400	25600	51200	6400	6400	12800	<50	3200	<50
	25600	25600	6400	12800	1600	6400	6400	<50	<50	800
	3200	12800	25600	25600	3200	12800	6400	<50	<50	<50
	3200	1600	3200	25600	6400	3200	<50	<50	<50	6400
	25600	6400	6400	102400	3200	6400	6400	12800	<50	<50
		12800	25600	12800			12800	<50		3200
Media:	17,422	11,680	15,680	28,160	4,133	5,867	6,578	1,320	361	1,045

TABLA 3

*Títulos de anticuerpo sérico anti-rPA el día 41 (3 dosis de vacuna del ántrax)*

Se indican los títulos de animales individuales (n=10) y la media para cada grupo.

Grupo:	1) IM	2) preABR	3) preABR	4) preABR	5) ABRdel	6) ABRdel	7) ABRdel	8) Tópica	9) Tópica	10) Tópica
Adyuvante:	alum	nada	alum	CpG	nada	alum	CpG	nada	alum	CpG
	25600	51200	51200	51200	25600	25600	25600	12800	200	3200
	51200	25600	51200	51200	25600	25600	51200	<50	50	<50
	25600	51200	25600	204800	25600	102400	25600	<50	1600	6400
	25600	12800	51200	102400	51200	51200	51200	<50	1600	<50
	102400	51200	51200	51200	25600	25600	102400	<50	3200	<50
	51200	25600	25600	51200	25600	25600	51200	<50	<50	6400
	51200	25600	51200	51200	12800	51200	51200	3200	100	100
	102400	12800	12800	51200	51200	51200	25600	50	400	12800
		25600	25600	51200	51200		102400	12800	100	800
		25600	25600	51200			204800	<50		6400
Media:	54,400	30,720	37,120	71,680	32,711	44,800	69,120	2,885	806	3,610

(En los casos en que se dan menos de 10 valores, los animales habían muerto)

Los resultados demuestran que se consiguen títulos importantes de anticuerpo sérico usando dispositivos microabrasivos para administrar una vacuna recombinante de subunidades. Los títulos de anticuerpos generados mediante la administración usando dispositivos microabrasivos son, por lo menos, tan altos como los generados mediante la vía convencional de inyección IM. La administración tópica sin dispositivos microabrasivos induce una respuesta comparativamente débil en algunos animales.. De modo similar al de los resultados presentados en el Ejemplo 11a, el protocolo “preABR” indujo mayores respuestas inmunitarias que el protocolo “ABRdel”, después de 1 ó 2 dosis de vacuna (Tablas 1 y 2). A la tercera dosis, sin embargo, los títulos eran comparables entre estos grupos (Tabla 3). Por tanto, el método más apropiado de administración usando dispositivos microabrasivos depende, al menos en parte, del tipo de sustancia que ha de ser administrada. rPA representa una vacuna de subunidades que consiste en una proteína recombinante. Los resultados expuestos en las Tablas 1-3 demuestran que esta clase de vacuna se administra mejor mediante tratamiento previo con el dispositivo microabrasivo, aun cuando en último lugar podrían inducirse también respuestas importantes mediante el método de “abrasión y distribución simultáneas”.

## ES 2 319 625 T3

Además, los resultados demuestran que el dispositivo y los métodos de la invención son compatibles con muchos tipos de adyuvantes de vacunas incluyendo, por ejemplo, alum y oligonucleótidos que contienen CpG.

5 Estos resultados demuestran que los dispositivos microabrasivos y las técnicas de la presente invención hacen posible la administración tópica de una amplia variedad de clases de vacunas y mejoran la distribución en muchos casos, en comparación con los métodos de administración convencionales que usan una aguja estándar y una jeringuilla.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (2) para administrar una sustancia a la piel, que comprende una superficie abrasiva (5) revestida con la sustancia y un depósito que contiene un líquido de reconstitución en comunicación fluida con la superficie abrasiva (5).
2. El dispositivo (2) según la reivindicación 1, en el que el depósito se comunica con la superficie abrasiva (5) mediante canales a través de microprotuberancias (14) sobre la superficie abrasiva (5).
3. El dispositivo (2) según la reivindicación 1, en el que el depósito se comunica con la superficie abrasiva (5) mediante canales entre microprotuberancias (14) sobre la superficie abrasiva (5).
4. El dispositivo (2) según la reivindicación 1, en el que el depósito se comunica con la superficie abrasiva (5) por medio de un material poroso situado entre el depósito y la superficie abrasiva (5).
5. El dispositivo (2) según la reivindicación 1, que comprende, además, una base (4) que comprende una faceta abrasiva adaptada para recibir dicha superficie abrasiva (5) o que forma un todo con ella.
6. El dispositivo (2) según la reivindicación (5), en el que dicha superficie abrasiva sobresale desde dicha faceta abrasiva.
7. El dispositivo (2) según la reivindicación (5), que comprende, además, una faceta (4c) de unión de un mango adecuada para unir un mango (6) a dicha base (4).
8. El dispositivo (2) según la reivindicación 5, que comprende, además, un mango (6) que es parte integrante de dicha base (4) o que puede desprenderse desde ella.
9. El dispositivo (2) según la reivindicación 8, en el que dicho mango (6) es separable.
10. El dispositivo (2) según la reivindicación 7, en el que dicha faceta (4c) de unión de un mango y dicha faceta abrasiva están dispuestas sustancialmente paralelas una con otra sobre lados opuestos de dicha base (4).
11. El dispositivo (2) según la reivindicación 7, en el que dicha base (4) comprende un borde liso que conecta dicha faceta abrasiva a dicha faceta (4c) de unión de un mango.
12. El dispositivo (2) según la reivindicación 11, en el que dicho borde liso forma un arco que conecta dicha faceta abrasiva a dicha faceta (4c) de unión de un mango.
13. El dispositivo (2) según la reivindicación 11, en el que dicha faceta abrasiva es sustancialmente circular de un primer diámetro, y dicha faceta (4c) de unión de un mango es sustancialmente circular de un segundo diámetro, y en el que dicho segundo diámetro es mayor que dicho primer diámetro.
14. El dispositivo (2) según la reivindicación 1, en el que la superficie abrasiva (5) es una disposición que comprende una pluralidad de microprotuberancias (14).
15. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que la sustancia está depositada como revestimiento sobre las microprotuberancias (14).
16. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que dichas microprotuberancias (14) son microprotuberancias (14) de forma troncocónica o de tronco de pirámide que comprenden al menos un borde de raspadura (20,22) y que sobresalen desde superficie abrasiva (5).
17. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que dichas microprotuberancias (14) están revestidas, al menos parcialmente, con dicha sustancia que ha de ser administrada.
18. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que dichas microprotuberancias (14) tienen una longitud suficiente para penetrar o atravesar la capa del estrato córneo de dicha piel.
19. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que dichas microprotuberancias (14) comprenden dos bordes de raspadura (20,22), por lo menos.
20. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que dichas microprotuberancias (14) comprenden tres facetas (16), por lo menos, y en el que la intersección de cualesquiera dos de dichas facetas forma un borde de raspadura (20, 22).
21. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que dichas microprotuberancias (14) comprenden una extremidad plana (18).

## ES 2 319 625 T3

22. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que dichas microprotuberancias (14) tienen bases de microprotuberancias y están construidas y dispuestas de una forma tal que la distancia entre los centros de dichas bases de microprotuberancias es, al menos, dos veces la longitud de dichas microprotuberancias.

5 23. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que dichas microprotuberancias (14) tienen bases de microprotuberancias y están construidas y dispuestas de una forma tal que la distancia entre los centros de dichas bases de microprotuberancias es, al menos, cinco veces la longitud de dichas microprotuberancias.

10 24. El dispositivo (2) según la reivindicación 22 ó 23, en el que dichas bases de dichas microprotuberancias (14) están distanciadas formando valles entre dichas microprotuberancias (14).

25. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que dichas microprotuberancias (14) están dispuestas de una forma.

15 26. El dispositivo (2) según la reivindicación 25, en el que dicha forma consiste en filas y columnas, o en el que dicha forma es una forma uniforme, circular o aleatoria.

20 27. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que la longitud de dichas microprotuberancias (14) es mayor que la profundidad a la que penetran en dicha piel.

28. El dispositivo (2) según la reivindicación 14, en el que la longitud de dichas microprotuberancias (14) es:

- (i) desde 5 a 500 micrómetros,
- 25 (ii) desde 30 a 300 micrómetros,
- (iii) desde 75 a 250 micrómetros, o
- 30 (iv) desde 180 a 220 micrómetros.

29. El dispositivo (2) según la reivindicación 1, en el que dicha superficie abrasiva (5) es de plástico o de silicio.

30. El dispositivo (2) según la reivindicación 1, en el que dicha sustancia es una sustancia bioactiva.

35 31. El dispositivo (2) según la reivindicación 30, en el que dicha sustancia bioactiva es:

- (i) un medicamento,
- 40 (ii) una vacuna,
- (iii) un alérgeno, o
- 45 (iv) un agente terapéutico génico.

32. El dispositivo (2) según la reivindicación 31 (ii), en el que dicha vacuna comprende:

- (i) un virus vivo, atenuado o un vector viral,
- 50 (ii) un virus inactivado o muerto,
- (iii) una bacteria inactivada o muerta,
- 55 (iv) un ácido nucleico,
- (v) un ácido nucleico y una proteína o un péptido codificados por dicho ácido nucleico.
- (vi) un virus vivo o una bacteria viva, sin atenuar,
- 60 (vii) un polisacárido o un conjugado de un polisacárido, o
- (viii) una proteína o un péptido.

65 33. El dispositivo (2) según la reivindicación 31 (ii) ó 32 (viii), en el que dicha vacuna comprende, además, un adyuvante.

## ES 2 319 625 T3

34. El dispositivo (2) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en el uso, el líquido de reconstitución puede separarse para disolver la sustancia a medida que el dispositivo se aplica a la piel para efectuar abrasión.

5        35. El dispositivo (2) según la reivindicación 5 ó 6, en el que la base (4) está configurada con la forma de una seta semejante a una corona (4b), que se curva hacia arriba y que está truncada en la parte superior.

36. El dispositivo (2) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo comprende, además, medios para regular la velocidad de liberación de la sustancia o del líquido de reconstitución.

10

37. Un kit que comprende, por lo menos, un dispositivo (2) según la reivindicación 1.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

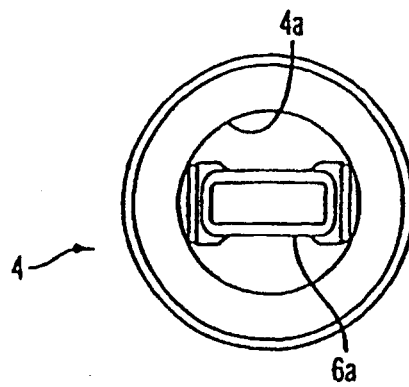


Figura 1A

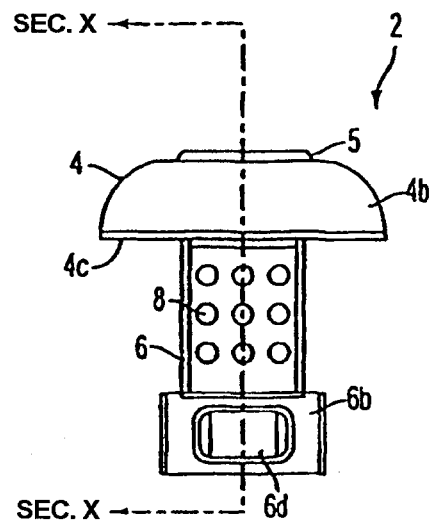


Figura 1B

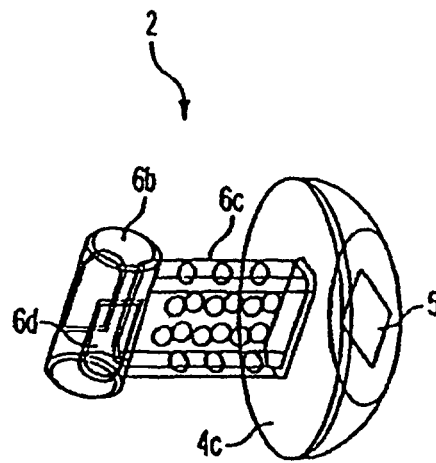


Figura 2A

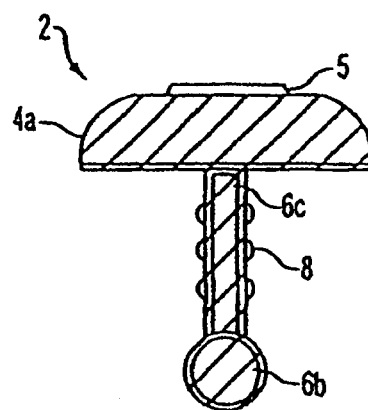


Figura 2B

Figura 3

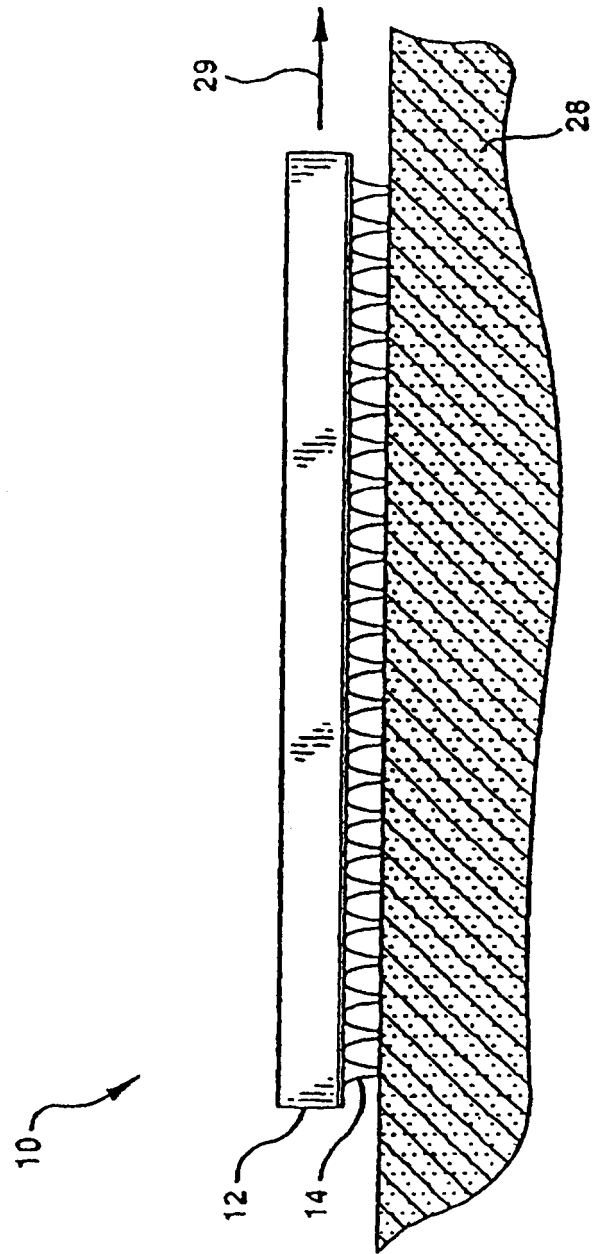


Figura 4

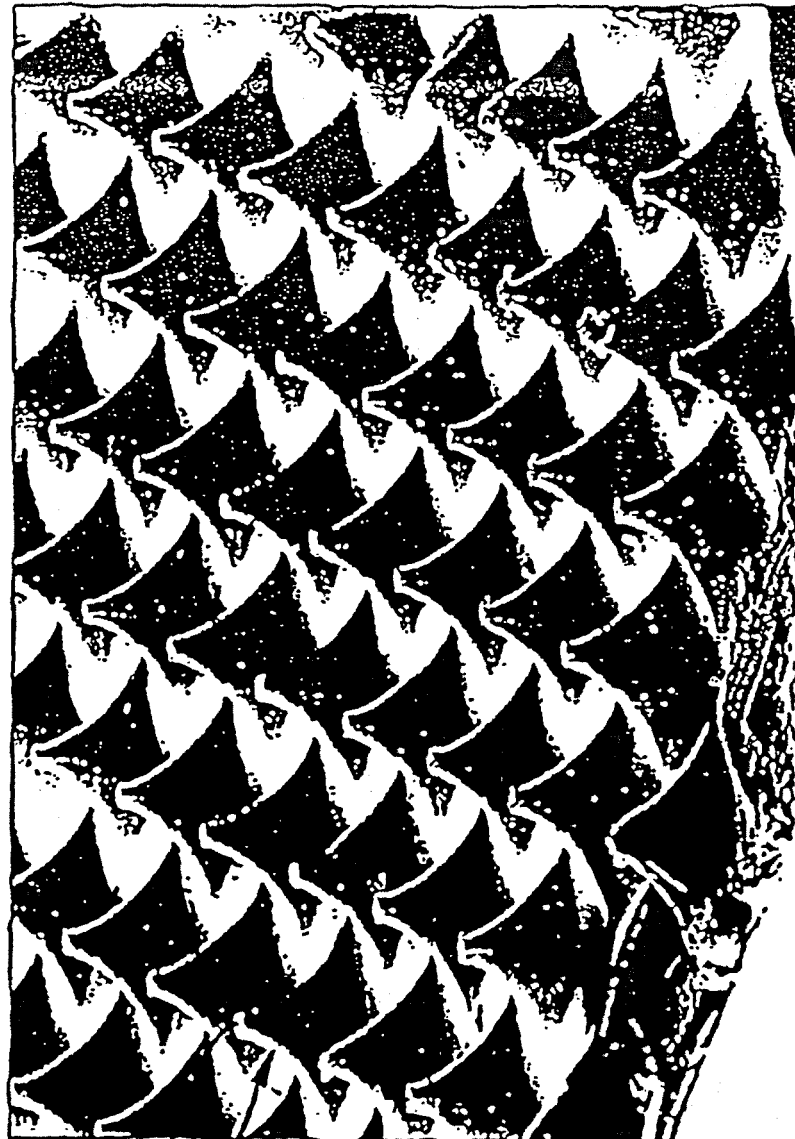
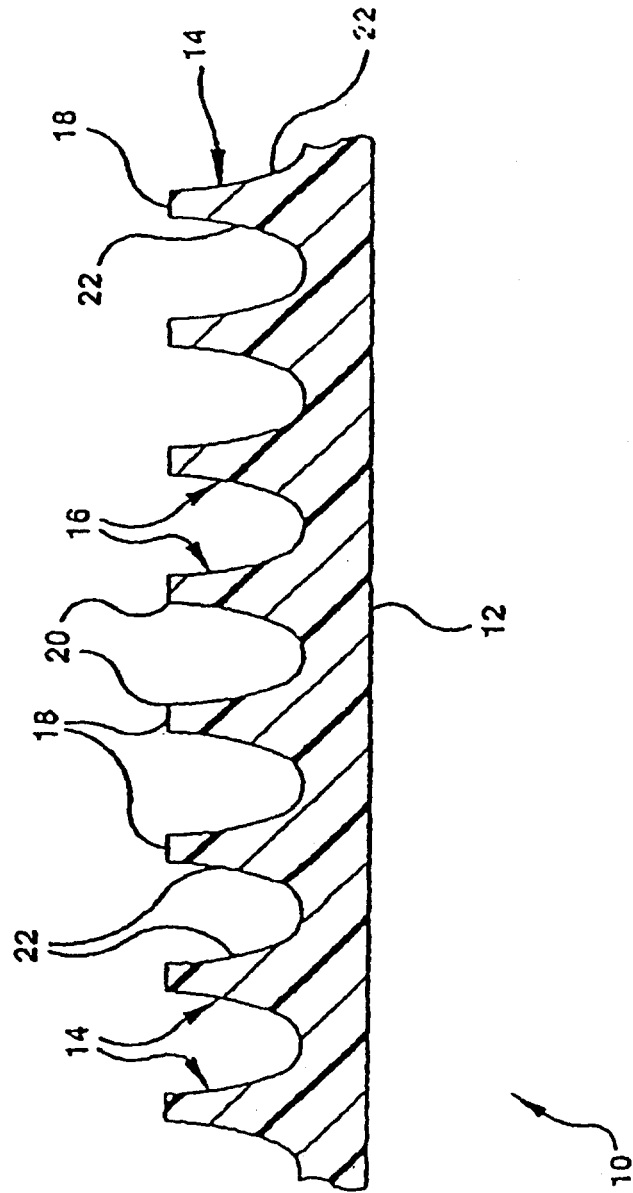


Figura 4a



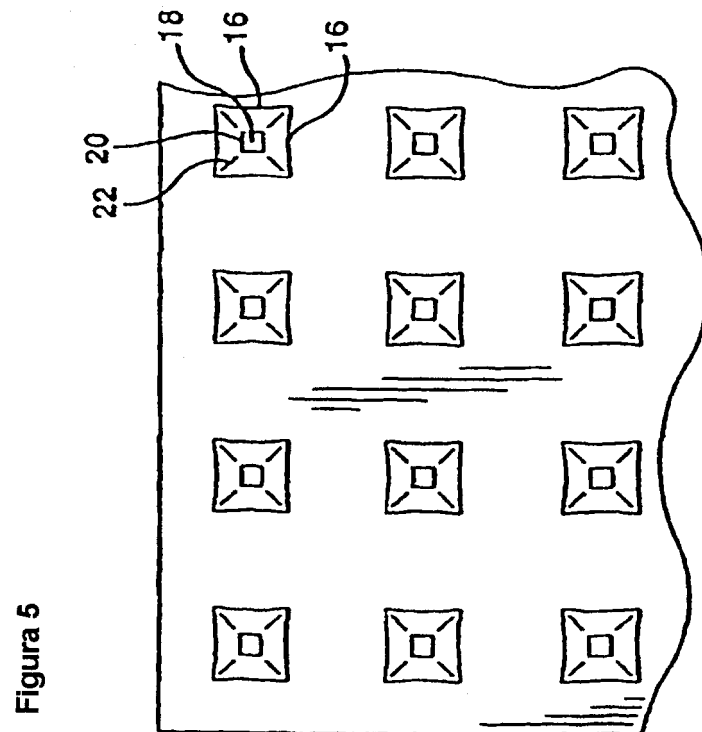


Figure 5

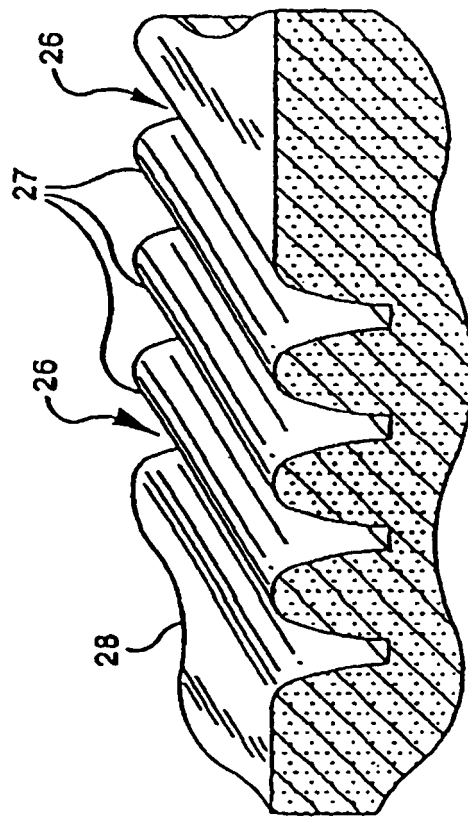


Figura 6

Figura 7

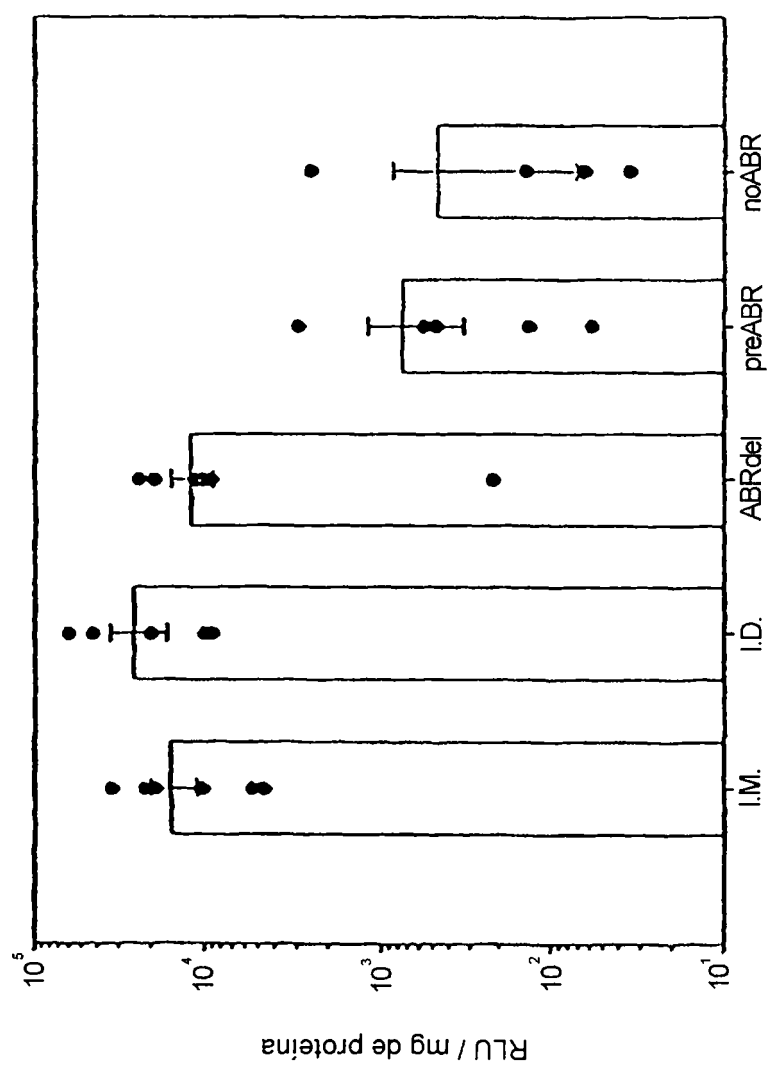


Figura 8

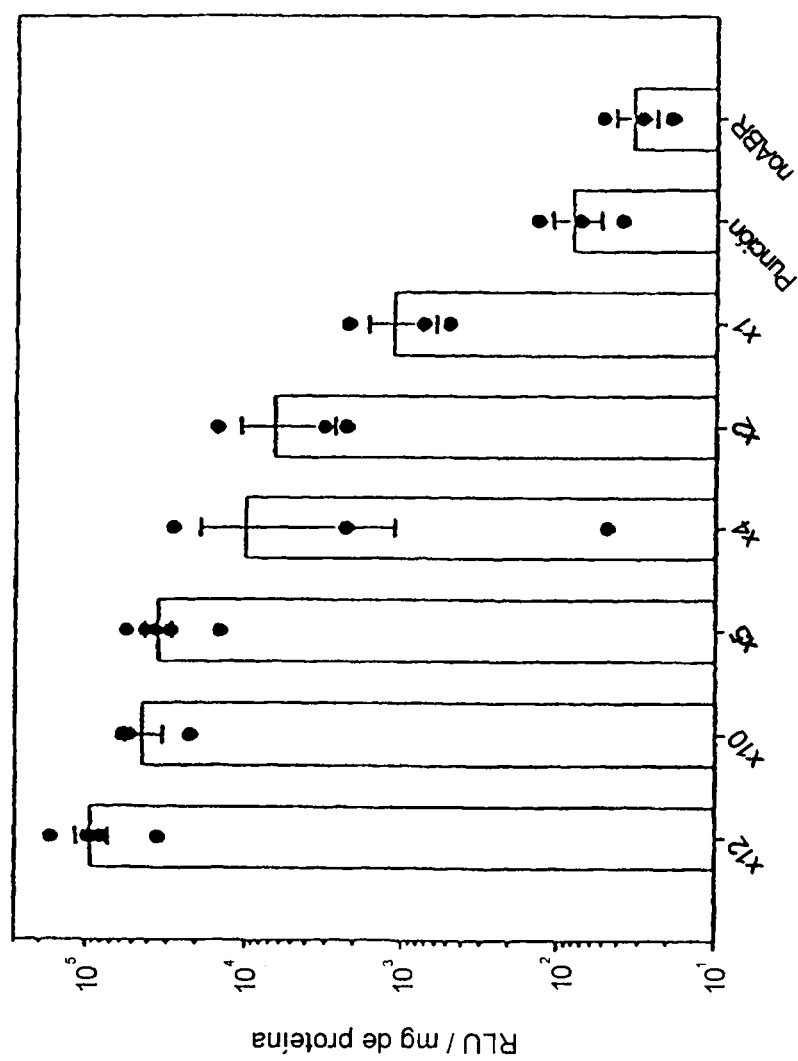


Figura 9

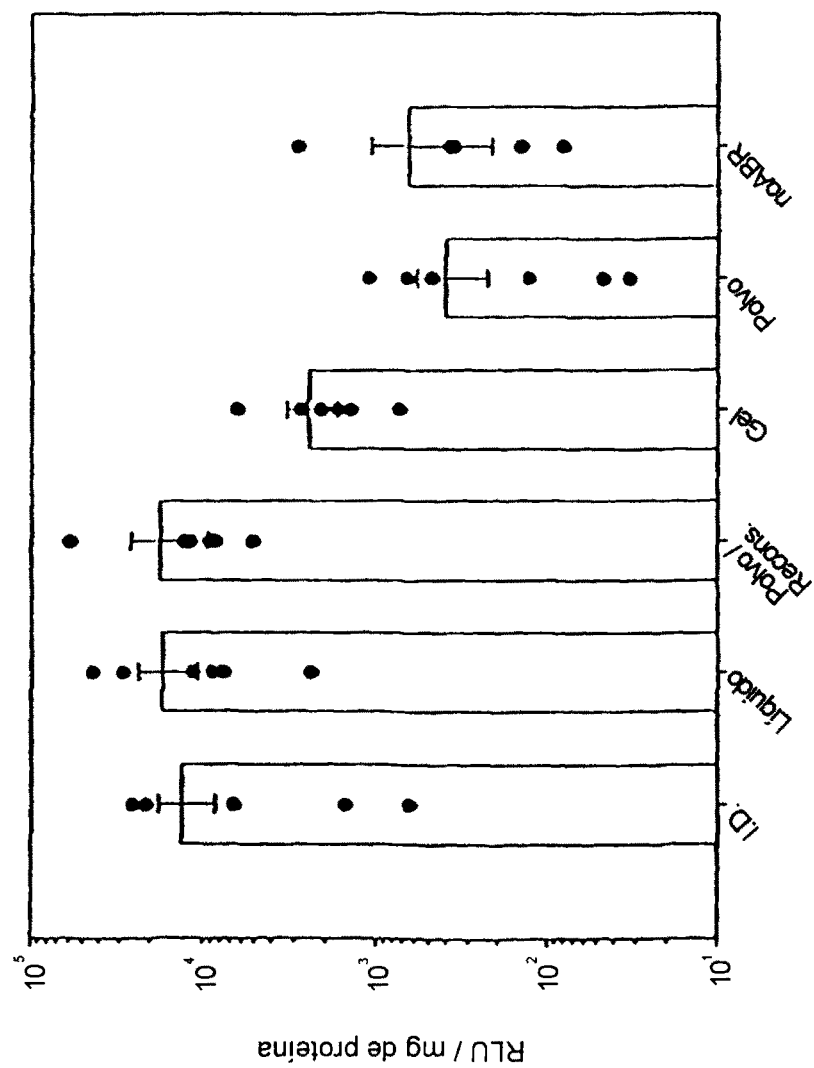


Figura 10

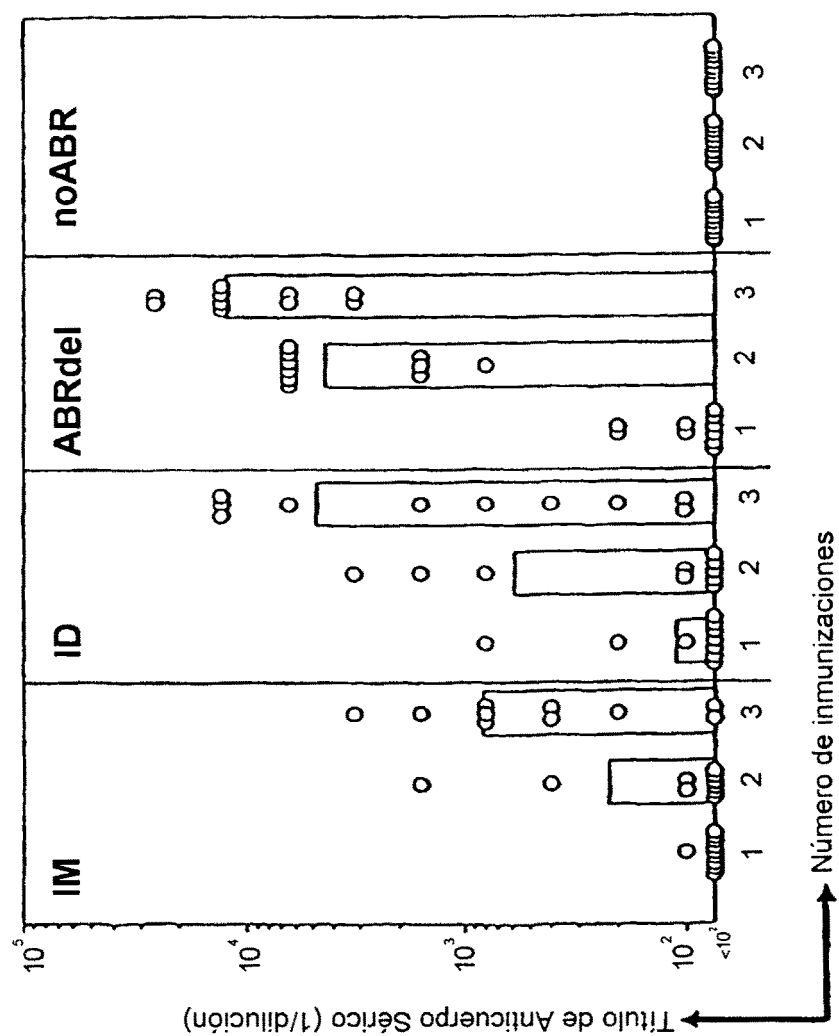


Figura 11

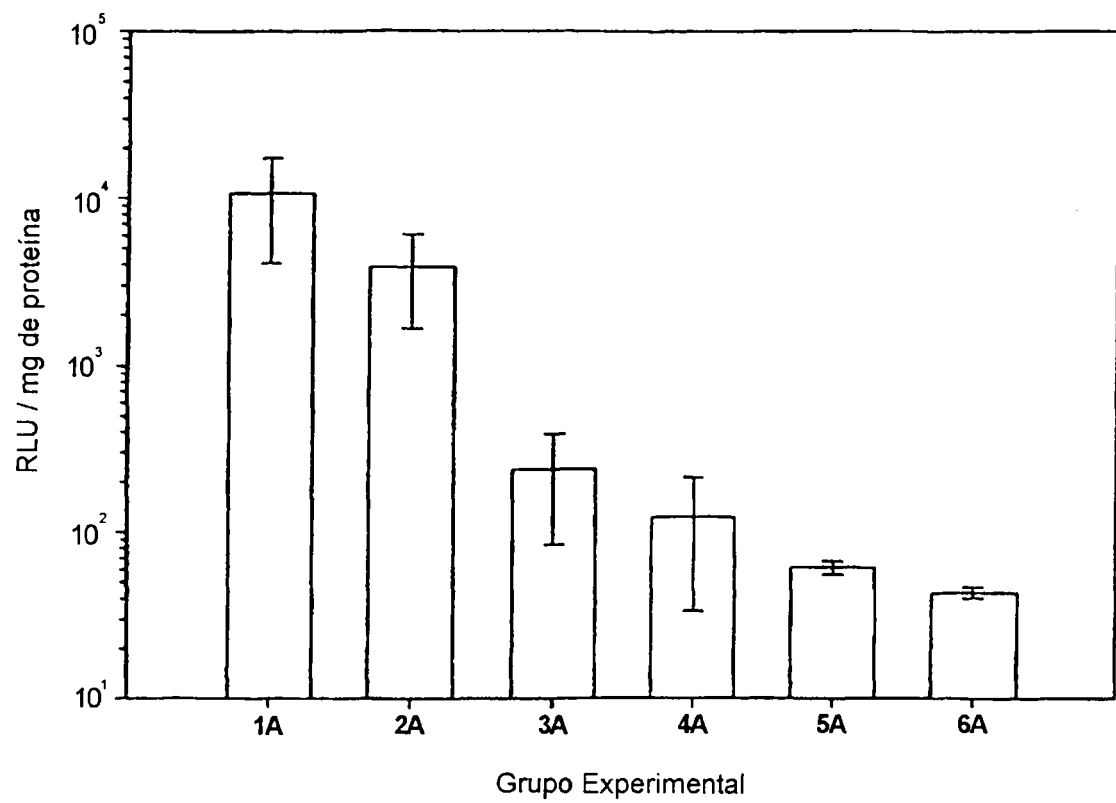


Figura 12

Grupo 1B



Grupo 2B



Grupo 3B



Grupo 4B

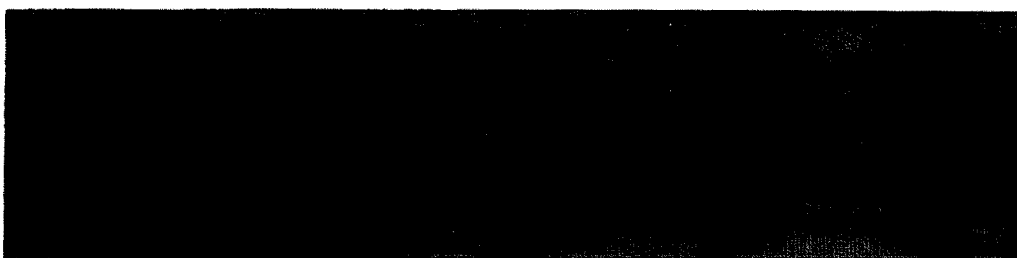


Figura 13

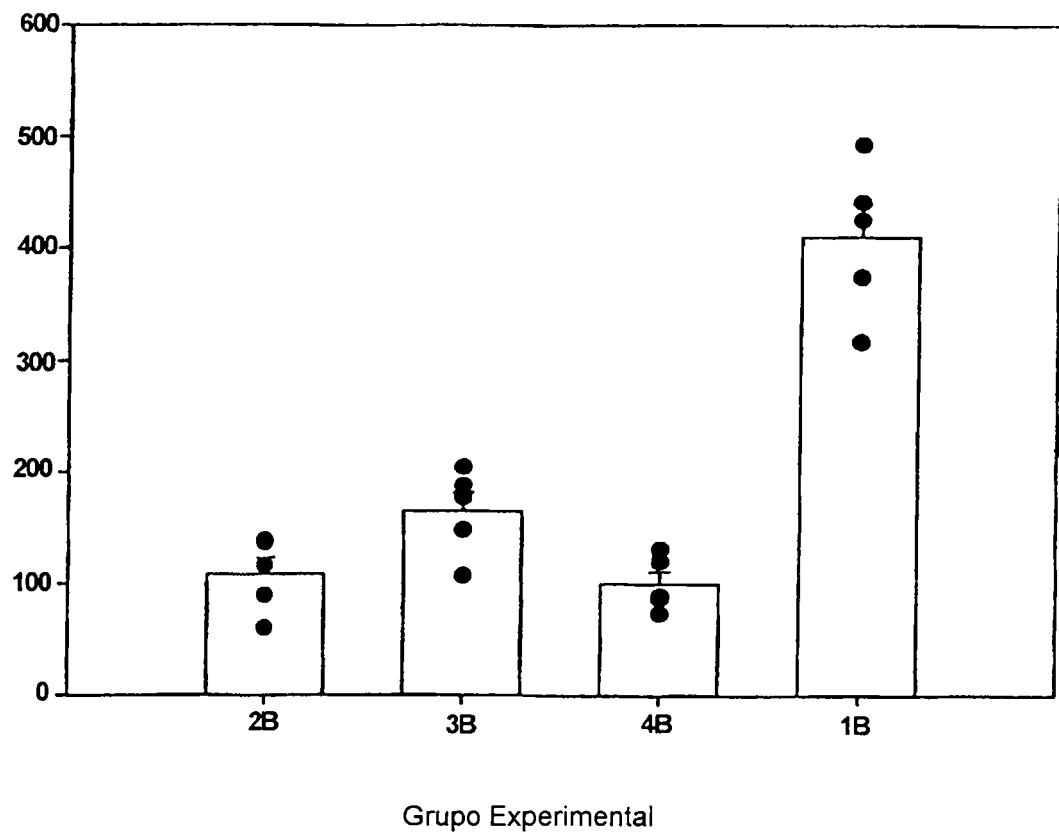


Figura 14

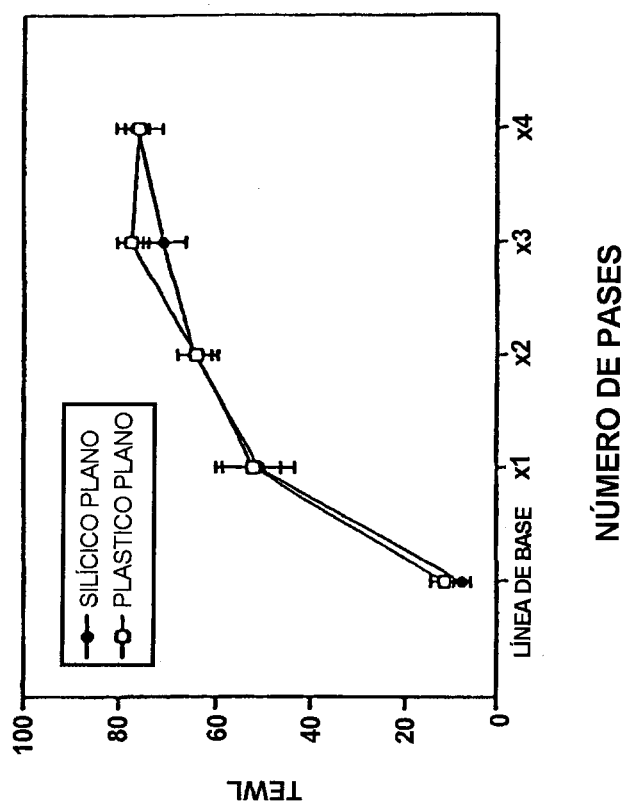


Figura 15

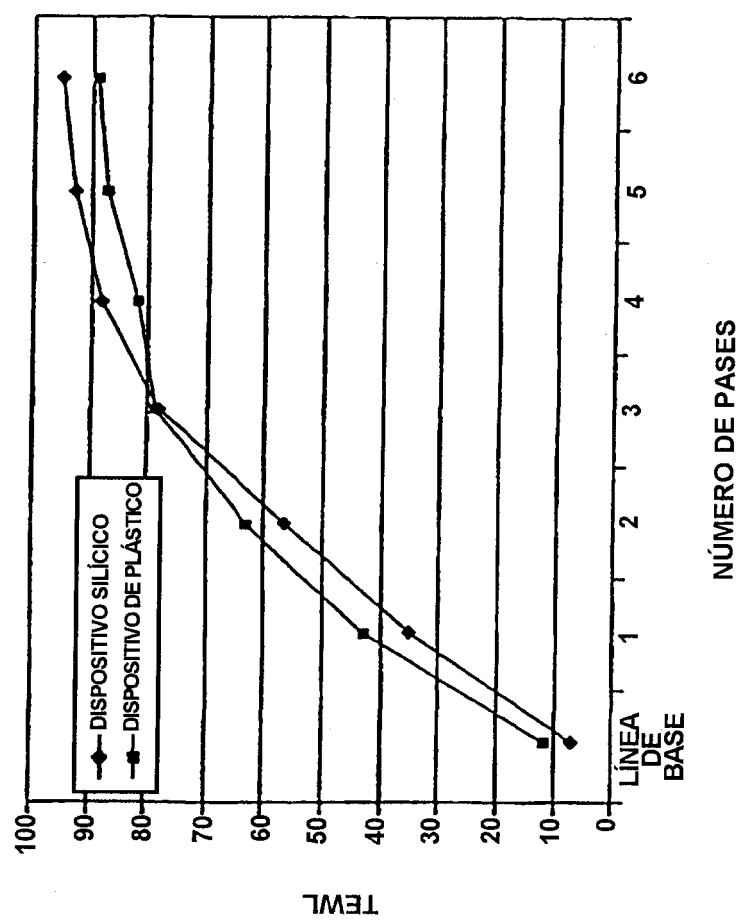


Figura 16

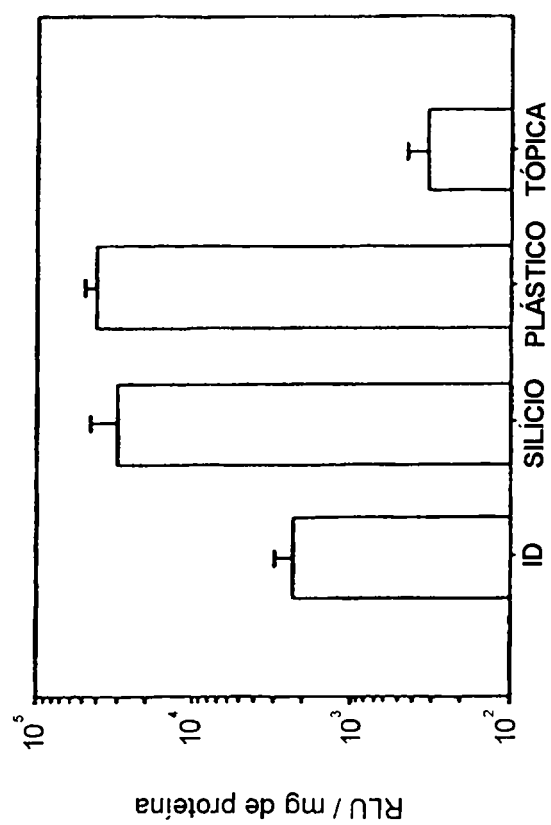


Figura 17

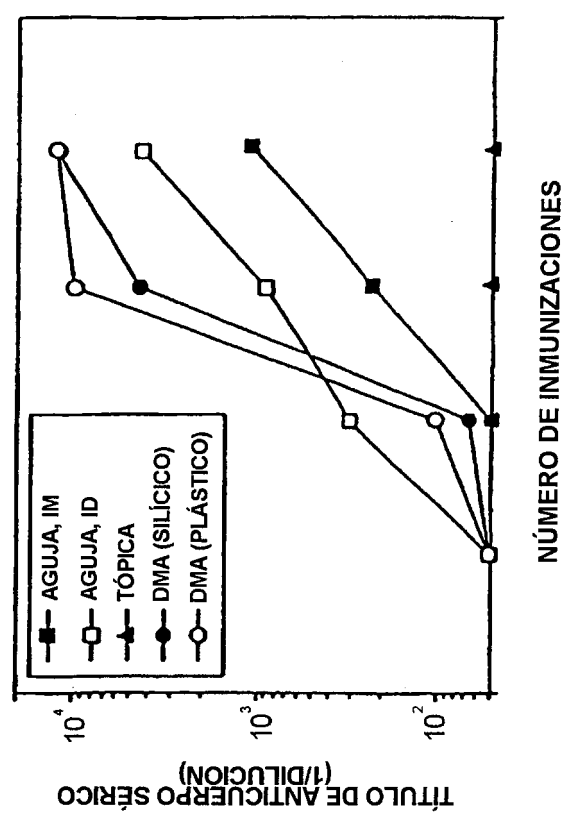


Figura 18

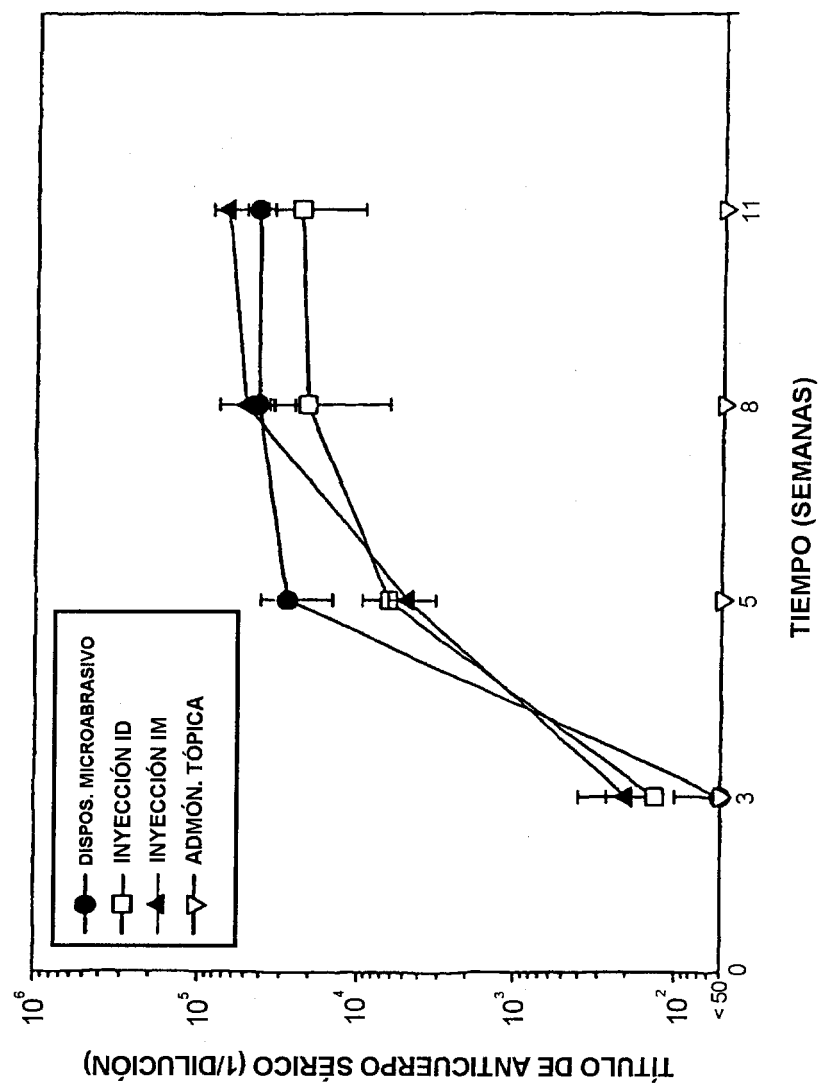


Figura 19

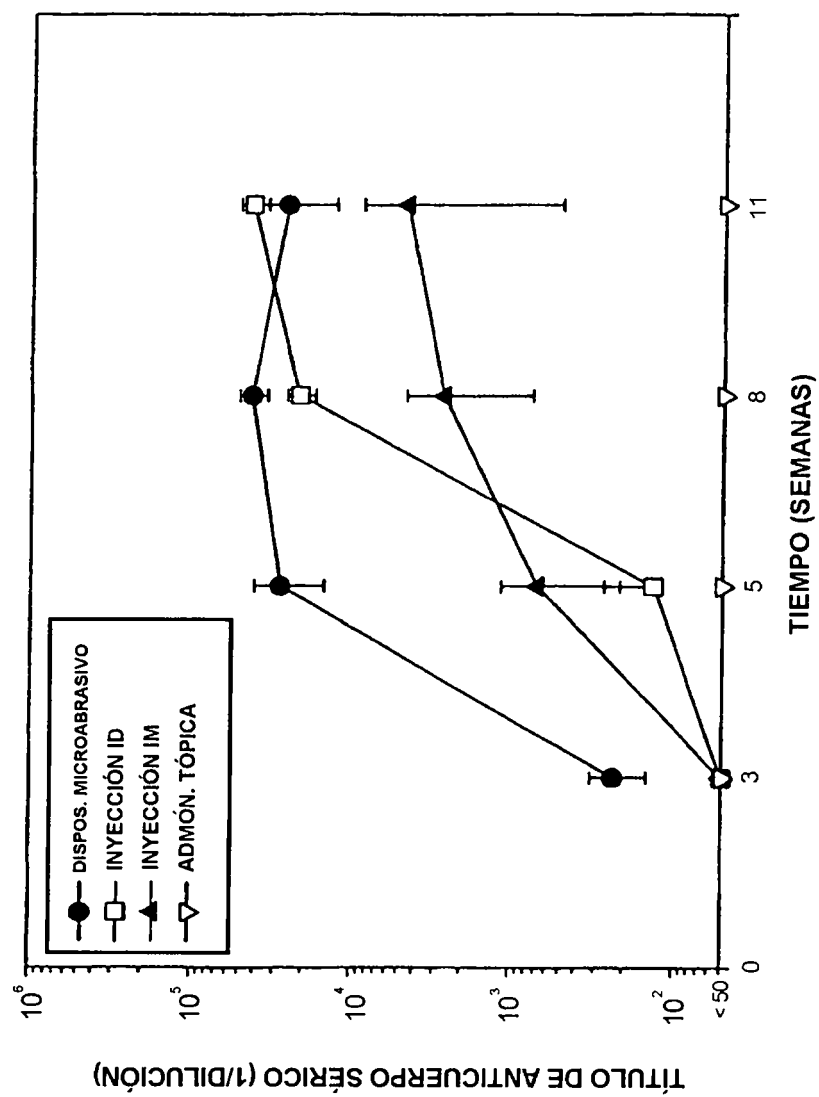


Figura 20

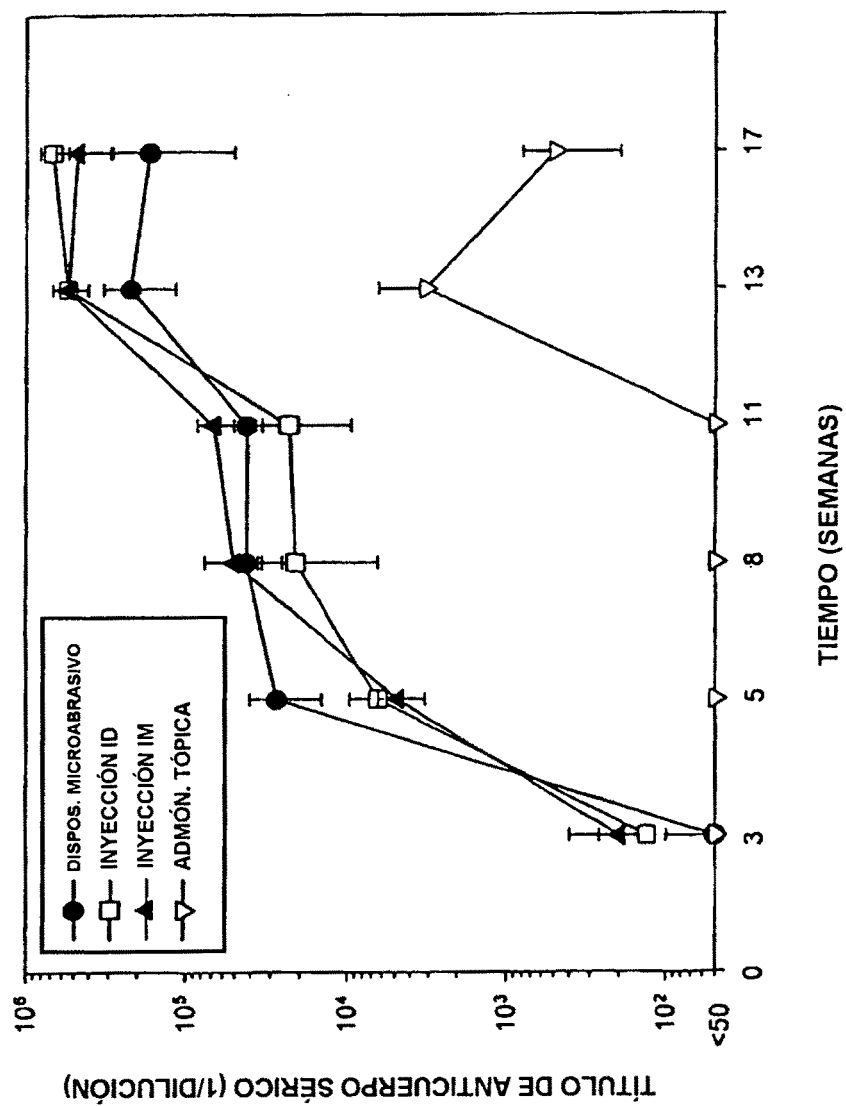


Figura 21

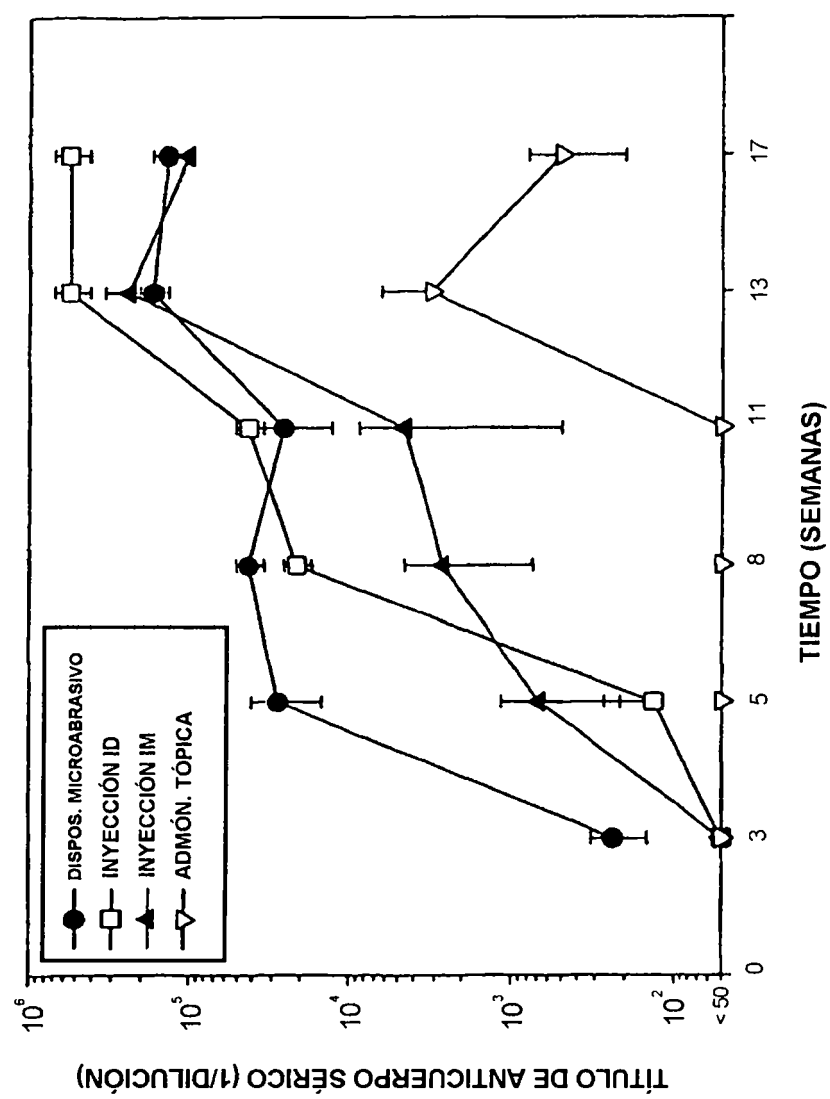


Figura 22

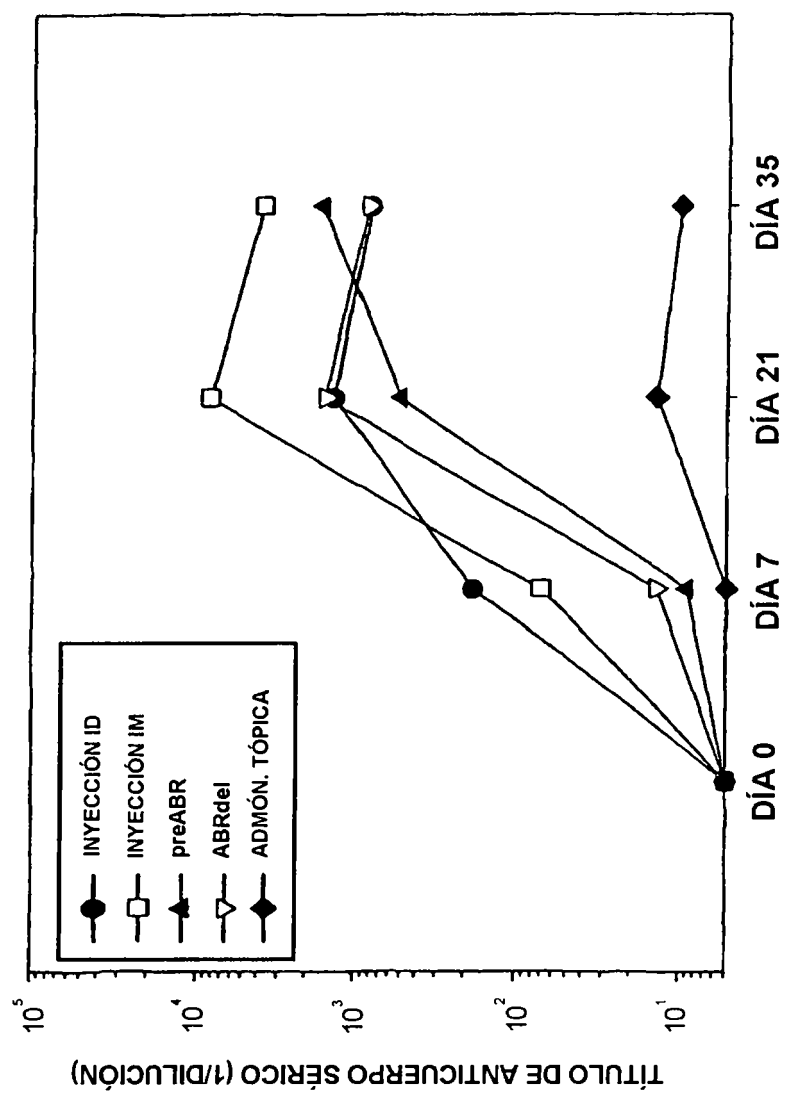


Figura 23

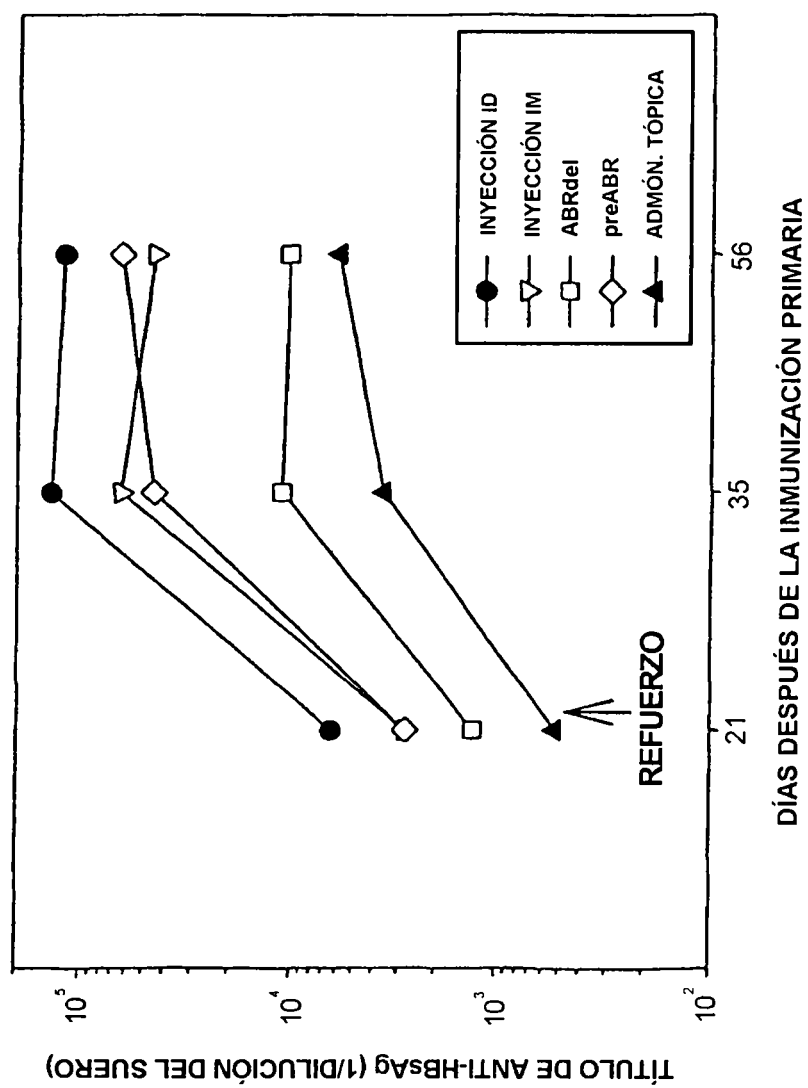


Figura 24

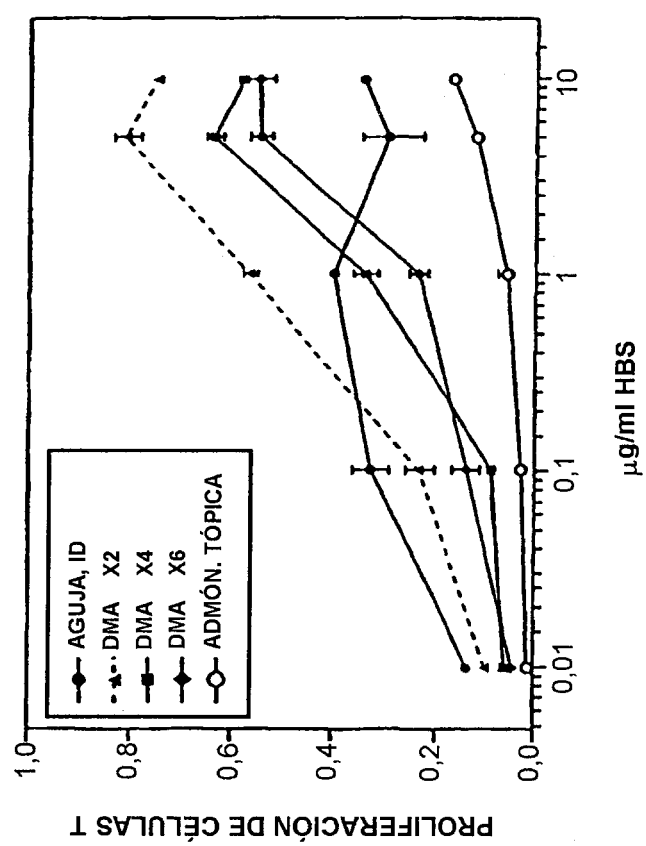


Figura 25

