



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 10 743 T2 2004.07.08

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 061 951 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 10 743.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/04128

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 936 034.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/043350

(86) PCT-Anmeldetag: 25.02.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 02.09.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 27.12.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 27.08.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 08.07.2004

(51) Int Cl.⁷: A61K 39/39

A61K 9/00, C12N 15/11

(30) Unionspriorität:

75850 P 25.02.1998 US

75856 P 25.02.1998 US

(73) Patentinhaber:

The Government of the United States, as
represented by the secretary of the army, Fort
Detrick, Md., US

(74) Vertreter:

Meissner, Bolte & Partner, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

GLENN, M., Gregory, Bethesda, US; ALVING, B.,
Carl, Bethesda, US

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON HAUTPENETRATIONSFÖRDERERN UND FÜR DIE ZERSTÖRUNG DER
OBEREN HAUTSCHICHTEN GEEIGNETEN MITTELN ZUR ERHÖHUNG DER DURCH ADP-RIBOSYLATING-EXOTOXIN INDUZIERTEN IMMUNANTWORT

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG 1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft transkutane Immunisierung unter Verwendung eines ADP-ribosylierenden Exotoxins, dessen bindende B-Untereinheit, oder Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins als Adjuvanz mit einem Antigen, und die Verwendung von Penetrationsförderern und für die Zerstörung der oberen Hautschichten geeigneten Mitteln zur Verstärkung der Immunantwort. Die Erfindung betrifft außerdem die Aktivierung des Antigens, Adjuvanz, deren Targets in der Haut, oder eine Kombination davon, zur Verstärkung der antigenspezifischen Immunantwort, die dagegen induziert wurde.

2. Beschreibung des Stands der Technik

[0002] Die Haut, das größte Organ des menschlichen Körpers, ist ein wichtiger Teil der Körperabwehr gegen die Invasion von infektiösen Agentien und Kontakt mit schädlichen Chemikalien (siehe Bos. 1997). Unerwünschte Hautreaktionen wie allergische oder atopische Dermatitis sind bekannt, aber das Auslösen einer systemischen Immunantwort durch Anwendung eines Adjuvanz und Antigens, das spezifische Immuneffektoren freisetzt und einen therapeutischen Vorteil vermittelt, durch die einfache Anwendung von Adjuvanz und Antigen auf der Haut scheint vor unserer Erfindung noch nicht gelehrt oder vorgeschlagen worden sein.

[0003] Choleratoxin (CT) und hitzelabiles Enterotoxin von *E. coli* (LT) sind Beispiele für eine schädliche Chemikalie, von der man erwarten würde, dass die schützenden Schichten der Haut gegen die Penetration durch diese schädlichen Substanzen schützen. Craig (1965) berichtete, dass Stuhlfiltrate von Cholerapatienten, die intrakutan in Kaninchen oder Meerschweinchen induziert wurden, eine charakteristisch verzögerte, anhaltende, ödemartige Verhärtung (Schwellung) hervorriefen, die durch die Anwesenheit von Toxin in der Haut induziert wurde. Die Schwellung und das Austreten von Flüssigkeit aus den Gefäßen (engl. "vascular leakage") war so dramatisch, dass es einem unbekannten Permeabilitätsfaktor zugesprochen wurde, von dem später gezeigt wurde, dass es sich um CT selbst handelte. Daher konnte man vernünftigerweise erwarten, dass CT extrem reaktionsfreudig (reaktogen) sein würde, wenn es auf die Haut aufgebracht wird, ähnliche Röte und Schwellung verursachend, wenn es in die Haut eindringt. Der Craig-Test des Injizierens von CT in die Haut wurde eine Standardmessung für die Anwesenheit und die Menge von CT in Stuhlfiltraten oder Kulturmedien. Daten bestätigten, dass diese Hautreakтивität auf Choleratoxin zurückzuführen war (siehe Finkelstein und LoSpallutto, 1969).

[0004] Craig (1965) warnte "Die Abwesenheit von Hautschäden bei klinischer Cholera schließt sicherlich nicht die Möglichkeit aus, dass die Schadstoffe, die für die Darmschädigung verantwortlich sind, auch eine schädliche Auswirkung auf die Haut haben können, vorausgesetzt, dass sie in ausreichender Konzentration auf die Haut angewendet werden." Die extreme Fähigkeit von Choleratoxin, eine Reaktion (Reaktogenität) in der Haut hervorzurufen, wurde als ein Test für seine Toxizität verwendet und der Stand der Technik bewies eine Erwartung, dass Choleratoxin reaktogen sein würde, wenn es auf der Haut angewendet würde, eine unerwünschte Reaktion hervorrufend. Solche nachteiligen Reaktionen sind durch bekannte Autoritäten auf dem Gebiet gut dokumentiert (Craig, 1972).

[0005] Im Gegensatz dazu haben wir gezeigt, dass Choleratoxin immunogen ist, sowohl als Antigen als auch als Adjuvanz wirkt, wenn auf die Haut aufgetragen wird, aber ohne irgendwelche daraus resultierende lokale oder systemische Nebenwirkungen. Dieses Fehlen von Reaktogenität, wenn Choleratoxin für transkutane Immunisierung auf die Haut aufgetragen wurde, war überraschend und stand im Gegensatz zu Schlussfolgerungen, die man aus dem Stand der Technik gezogen hätte. Insbesondere wirkt CT, das erfahrungsgemäß auf die Haut aufgetragen wurde, als ein nicht-toxisches, nicht reaktogenes Adjuvanz, im Gegensatz zu den Erwartungen von Craig, während Injektion von CT in die Haut Schwellung und Rötung hervorruft. Daher war es vor unserer Erfindung nicht naheliegend, dass Choleratoxin oder andere ADP-ribosylierende Exotoxine, wenn sie topisch angewendet werden, für transkutane Immunisierung verwendbar sind. Tatsächlich ist gezeigt worden, dass hohe Dosen von hitzelabilem Enterotoxin (LT), das auf die Haut von Menschen aufgetragen wurde, eine systemische Immunantwort ohne lokale oder systemische Toxizität induziert.

[0006] Diese unerwartete Fehlen von Reaktogenität ist sehr wichtig für die Verwendung von Vakzinen. Vakzin-Antigene und -Adjuvanzien sind verwendbar, wenn die Immunisierung eine schützende Immunantwort ohne signifikante, unerwünschte Reaktionen hervorruft. Historisch gesehen wurde die Reaktogenität von Vakzinen wie Schwellung, Schmerzempfindlichkeit und Schmerzen an der Injektionsstelle in einigen Fällen (z. B. Typhoid und Pertussis) wegen der Vorteile der Vakzinierung akzeptiert. Hohe Grade an Reaktogenität und andere Nebenwirkungen sind jedoch unerwünscht und wären problematisch für die Entwicklung von neuen Vakzine-Adjuvanz und Antigenkandidaten. Forschungsbemühungen konzentrieren sich auf die Herstellung von Vakzine-Adjuvanzien, die stimulatorisch sind, aber keine unerwünschten Reaktionen hervorrufen. Gesamtrett-pertussis-Vakzinen induzieren systemische und lokale Nebenwirkungen und als Ergebnis wird diese wirksame

Vakzine und bewährte Vakzine durch azelluläre Pertussisvakzinen ersetzt, nur weil diese weniger reaktogen sind.

[0007] Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich von der des Patents Nr. 5,830,877, welches die Verwendung eines nackten Plasmids lehrt, das biologisch aktive Peptide in einem Säugerwirt kodiert. Die hier beschriebene Erfindung lehrt die Verwendung von einem ADP-ribosylierenden Exotoxin-Adjuvant und -Antigen oder Nukleinsäure, die zusammen auf der Haut verabreicht werden, um eine Immunantwort zu induzieren. Die hier beschriebene Erfindung unterscheidet sich weiterhin von der des Patents Nr. 5,830,877, die von der Verwendung von Peptiden wegführt, die nicht auf einer Nukleinsäure kodiert sind und von der Wirtszelle produziert werden, wegen der Toxizität, die mit biologisch aktiven Peptiden assoziiert ist, den Problemen und Kosten der Isolierung, Aufreinigung und Synthese von Peptiden und ihren kurzen Halbwertszeiten in vivo, die sich aus der Degradation durch Proteasen, die im Targetgewebe vorhanden sind, ergeben. Dies führt weg von dem Zusatz eines Adjuvant, wie einem Choleratoxin, zu einem gemeinsam verabreichten Antigen oder einer Nukleinsäure. Tatsächlich hat die Neuheit der Fähigkeit eines großen Moleküls wie CT, eine Immunantwort durch Anwendung durch die Haut ohne Toxizität zu induzieren, zu einer Vielzahl von wissenschaftlichen Veröffentlichungen geführt, die diese Neuheit und öffentliche Aufregung über die möglichen Implikationen eines Proteintransfers für Vakzinierung durch Hautanwendung beschrieben. Im Gegensatz zu Patent Nr. 5,830,877 hängt die Erfindung nicht von lokaler Entzündung oder Reizung ab, um die Permeabilität von Zellmembranen zu erhöhen, um die Aufnahme des Antigens, Plasmids oder RNA zu verstärken. Tatsächlich ist das herausragende Merkmal in Bezug auf die transkutane Immunisierung das Fehlen von lokaler Entzündung.

[0008] Im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung lehrt Patent Nr. 5,824,313 die Anwendung von extrem kleinen (weniger als 500 Daltons) Lymphoidorgan-modifizierenden Agentien wie 1,25-Dihydroxy- λ -en Vitamin D₃ und Calzipotrien oder Dehydroepiandrosteron (DHEA), DHEA-Artverwandte und DHEA-Derivative mit der intramuskulären Injektion von einem Antigen, um Antikörperantworten zu bewirken.

[0009] Transkutane Immunisierung erfordert sowohl die Passage eines Antigens durch die äußeren Barrieren der Haut, von denen angenommen wurde, dass sie undurchlässig für eine solche Passage sind, und einer Immunantwort auf das Antigen. Fisher's Kontaktdermatitis stellt fest, dass Moleküle von mehr als 500 Daltons die Haut normalerweise nicht durchdringen können. Es gibt einen Bericht bei Paul et al. (1995) über die Induktion einer Immunantwort mit Transferosomen, einer Lipidstruktur, die sich von Liposomen unterscheidet. In dieser Veröffentlichung wurden die Transferosome als ein Vehikel für Antigen (Rinderserumalbumin und Gap-junction-Proteine) verwendet, und die Komplement-vermittelte Lyse von Antigen-sensibilisierten Liposomen wurde gemessen. Die Grenze für die Durchdringung der Haut durch Antigen wurde mit 750 Daltons beschrieben. In ihrer Studie wurde keine Immunantwort induziert, wenn eine Antigen-enthaltende Lösung auf die Haut aufgebracht wurde; nur Transferosome waren in der Lage, eine Immunantwort zu induzieren. Paul und Cvec (1995) stellten außerdem fest, dass es „unmöglich ist, mit einfachen Peptid- oder Proteinlösungen epikutan zu immunisieren“.

[0010] Solche Referenzen erklären, warum unsere erfolgreiche Verwendung eines Moleküls wie Choleratoxin (das 85.000 Daltons aufweist) als ein Antigen oder Adjuvant in der Immunisierung durch das Fachgebiet mit Überraschung aufgenommen wurde, weil von solch großen Molekülen nicht erwartet wurde, dass sie die Haut durchdringen, und daher wurde von ihnen nicht erwartet, dass sie eine spezifische Immunantwort induzieren. Wir haben jedoch in der US-Anmeldung Nr. 08/749,164 (eingereicht am 14. November 1996, US 5,910,306); der US-Anmeldung Nr. 08/896,085 (eingereicht am 17. Juli 1997, US 5,980,989) und in der internationalen Anmeldung PCT/US97/21324 (eingereicht am 14. November 1997, WO 98/20734) gezeigt, dass die Verwendung eines ADP-ribosylierenden Exotoxin wie Choleratoxin als ein Antigen eine starke Antikörperantwort auslösen kann, die hoch reproduzierbar ist. Wenn ein ADP-ribosylierendes Exotoxin wie Choleratoxin als Immun-Adjuvant verwendet wurde und in einer Salzlösung mit einem separaten Antigen (z. B. Diphtheriatoxoid) auf die Haut aufgebracht wurde, konnte eine systemische und mukosale Antigen-spezifische Antikörperantwort ausgelöst werden. In der vorliegenden Anmeldung offenbaren wir, dass transkutane Immunisierung unter Verwendung eines Penetationsförderers, eines für die Zerstörung der oberen Hautschichten geeigneten Mittels oder Kombinationen davon, die adjuvante Aktivität eines bakteriellen Exotoxins verbessern können.

[0011] Wir haben gezeigt, dass hitzelabiles Enterotoxin von *E. coli* (LT), *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA), Pertussistoxin (PT) und eine große Vielzahl von Antigenen, einschließlich abgetöteten Rabiesvirus, Rekombinante wie HIV p55 gag, Polysaccharidkonjugate wie Hib, Ultraschallextrakte, zum Beispiel Pertaktin, wie Choleratoxin (CT) in der Lage sind, die Haut zu durchdringen und eine Immunantwort auszulösen. Zusätzlich können CT, LT, ETA und PT und bakterielle DNA als Adjuvantien wirken, um eine Immunantwort gegen Antigene zu induzieren, die mit auf die Haut verabreicht wurden. Daher kann Tetanustoxoid, das selbst auf der Haut nicht immunogen ist, eine starke Immunantwort induzieren, wenn es mit CT auf die Haut aufgebracht wird. Wir haben vorgeschlagen, dass die Population von Langerhans-Zellen, die unterhalb der Aufbringungsstelle liegt, bevorzugte Antigen-präsentierende Zellen für den Transfer von Antigen zum Immunsystem darstellen. Das Adjuvant kann auf die Antigen-präsentierende Zelle direkt oder durch Lymphozyten, die das Antigen erkennen, einwirken.

[0012] Wir schlagen vor, die Immunantwort auf transkutanes Adjuvanz und/oder Antigen durch Verwendung von penetrationsfördernden Techniken zu verstärken. Nach Hurley "verdankt die Haut ihre Haltbarkeit der Dermis, aber die chemische Undurchlässigkeit befindet sich in der Epidermis und nahezu ausschließlich in ihrer toten äußeren Schicht, dem Stratum Corneum." Für transkutane Immunisierung unter Verwendung von beispielsweise einem ADP-ribosylierenden Exotoxin als Adjuvanz und einem löslichen Proteinantigen, wie Diphtherietoxoid, muss eine Penetration des Stratum Corneum stattfinden.

[0013] Penetrationsfördernde Techniken würden so ausgestaltet werden, dass sie die Bewegung von transkutanen Antigenen und Adjuvanzien durch die Stratum Corneum-Schicht der Haut verstärken.

[0014] Des Weiteren schlagen wir vor, dass transkutane Immunisierung unter Verwendung von Aktivierung von mindestens einem der Antigen-, Adjuvanz- oder Hautkomponente, die Immunantwort verstärken wird, gemessen an quantitativen und qualitativen Parameter. Das Antigen-Adjuvanz der Formulierung kann durch Trypsinspaltung eines bakteriellen Exotoxins (z. B. Trypsin-gespaltenes LT, mit oder ohne Reduktion) aktiviert werden. Aktivierung der Haut an der Auftragsstelle der Formulierung kann durch die Verwendung von für die Zerstörung der oberen Hautschichten geeigneten Mitteln (z. B. Aceton, Alkohol) erreicht werden, was die Größe oder Aktivierung der unterhalb liegenden Langerhans-Zellpopulation erhöht, oder durch ein Enzym oder Kombination von Enzymen (z. B. Enzymen mit Sialidaseaktivität), was die Erreichbarkeitsmenge von Gangliosid GM1-Rezeptor erhöht.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung von mindestens einem Antigen bereit, mindestens einem ADP-ribosylierenden Exotoxin, dessen bindender B-Untereinheit oder Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins als Adjuvanz, und eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers bereit, zur Herstellung einer Zusammensetzung für die transkutane Immunisierung durch Induzieren einer antigenspezifischen Immunantwort in einem Subjekt, wobei die Formulierung in einer therapeutisch wirksamen Menge auf die vorbehandelte Fläche der Haut des Subjekts, die nicht perforiert ist, aufgebracht wird und die Vorbehandlung mindestens das Stratum Corneum der Haut angreift.

[0016] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung einen Artikel für transkutane Immunisierung bereit, umfassend (i) eine Zusammensetzung, die mindestens ein Antigen und mindestens ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder ein Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins als Adjuvanz einschließt; (ii) ein Verband, der zur Adhäsion geeignet ist; und (iii) einen Verstärker der Hautpenetration, wobei der Artikel so angepasst ist, dass die Zusammensetzung unter dem Verband auf die Haut des Subjekts aufgebracht wird und der Verstärker der Hautpenetration so angepasst ist, dass er zumindest das Stratum Corneum der Haut ohne Perforation angreift.

[0017] Erfindungsgemäß wird auch ein Kit für dies transkutane Immunisierung bereitgestellt, umfassend: mindestens ein Antigen und mindestens ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins als Adjuvanz in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger; und

mindestens ein Verstärker der Hautpenetration oder eine Vorrichtung zum Angreifen einer Barriere, wobei der Verstärker der Hautpenetration oder die Vorrichtung zum Angreifen einer Barriere so ausgelegt sind, dass sie zumindest das Stratum Corneum der Haut des Subjekts angreifen, ohne die Haut des Subjekts zu perforieren, um eine Immunantwort zu induzieren, die für das Antigen spezifisch ist.

[0018] Die Erfindung stellt außerdem eine Vorrichtung zum Überwinden einer Barriere mit einer Vielzahl von Zinken bzw. Zacken für die transkutane Immunisierung bereit, wobei die Zacken mit einer Zusammensetzung beschichtet sind, die mindestens ein Antigen und mindestens ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder Toxoid des ADP-ribosylierenden Exotoxins enthält, und wobei die Zacken so ausgebildet sind, dass sie zumindest das Stratum Corneum der Haut des Subjekts angreifen, ohne die Haut des Subjekts zu perforieren.

[0019] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Treibmittelvorrichtung für die transkutane Immunisierung, wie ein Abschussgerät, wobei die Vorrichtung eine Formulierung umfasst, die mindestens ein Antigen und mindestens ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins als Adjuvanz enthält, und wobei die Vorrichtung so ausgelegt ist, dass sie die Formulierung durch Penetration in die Epidermis oder oberflächliche Dermis der Haut eines Subjekts verabreicht, aber die Dermis nicht penetriert.

[0020] Insbesondere kann das Adjuvanz oder Antigen oder die Haut die Penetration des Stratum Corneum oder der Epidermis unterstützen, um den Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (z. B. Langerhanszellen in der Epidermis, dermale dendritische Zellen, dendritische Zellen, folliculäre dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) zu begegnen und/oder die Antigen-präsentierenden Zellen zu veranlassen, das Antigen zu phagozytieren. Die Antigen-präsentierenden Zellen präsentieren dann das Antigen den T- und B-Zellen. Im Fall der Langerhanszellen können die Antigen-präsentierenden Zellen dann von der Haut zu den

Lymphknoten wandern und Antigen den Lymphozyten präsentieren (z. B. B- und/oder T-Zellen), wodurch sie eine antigenspezifische Immunantwort induzieren.

[0021] Zusätzlich kann die Aktivierung des Antigens, Adjuvanz, der Haut oder einer Kombination davon erreicht werden, um den Immunisierungsprozess zu unterstützen.

[0022] Zusätzlich zum Auslösen von Immunreaktionen, die zur Bildung eines antigenspezifischen B-Lymphozyten und/oder T-Lymphozyten einschließlich eines zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) führen, ist es eine weitere Aufgabe der Endung, durch Verwendung des transkutanen Immunisierungssystems, Komponenten des Immunsystems positiv und/oder negativ zu regulieren, um antigenspezifische Helper (Th1 und/oder Th2) oder Hypersensitivität (DTH) T-Zelluntergruppen vom verzögerten Typ zu beeinflussen. Dies kann durch das unterschiedliche Verhalten von CT und LT veranschaulicht werden, das unterschiedliche T-Helperantworten oder unterschiedliche Grade von Schutz in vivo Challenge Formen bei Verwendung von transkutaner Immunisierung zur Folge haben kann.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0023] **Abb.** 1a-f sind Photographien, die keine Entzündung an der Stelle der Immunisierung (A, B), Aktivierung von Langerhanszellen durch LT in menschlicher Haut an der Stelle der Immunisierung (C, E) und das Fehlen der Aktivierung von Langerhanszellen in der Haut des kontralateralen Arms (D, F) zeigen.

[0024] **Abb.** 2a-d sind Photographien, die normale Langerhanszellen (A, B, 200- und 400-fach) und die Aktivierung von Langerhanszellen durch Choleratoxin in Maushaut (C, D, 200-fach und 400-fach) zeigen.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORM

[0025] Die verschiedenen Aspekte der Erfindung, für die um Schutz ersucht wird, sind in den anhängenden Ansprüchen definiert. In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine erfindungsgemäß hergestellte Formulierung, die ein Antigen und Adjuvanz wie CT und DT enthält, nach Förderung der Penetration der Haut auf die intakte Haut eines Organismus aufgebracht, das Antigen wird Immunzellen präsentiert und eine antigenspezifische Immunantwort wird induziert, ohne die Haut zu perforieren. Die Formulierung kann zusätzliche Antigene und Nukleinsäuren enthalten, so dass eine transkutane Anwendung der Formulierung eine Immunantwort gegen mehrere Antigene induziert oder Nukleinsäuren, die für Antigene kodieren, vorzugsweise von 2 bis 20, aber möglicherweise bis zu 200. In einem solchen Fall kann, muss aber nicht, das Antigen aus der gleichen Quelle stammen, die Antigene werden aber unterschiedliche chemische Strukturen haben, so dass Immunantworten spezifisch für die unterschiedlichen Antigene induziert werden. Antigenspezifische Lymphozyten können an der Immunantwort beteiligt sein, und im Fall der Beteiligung von B-Lymphozyten können antigenspezifische Antikörper Teil der Immunantwort sein.

[0026] Die erfindungsgemäß hergestellte Formulierung kann verwendet werden, um einen Organismus zu behandeln. Wenn das Antigen von einem Pathogen abgeleitet ist, vakziniert die Behandlung den Organismus gegen Infektion durch das Pathogen oder gegen seine pathogene Wirkungen wie solche, die durch Toxinsekretion verursacht werden. Eine Formulierung, die ein Tumorantigen beinhaltet, kann eine Krebsbehandlung bereitstellen; eine Formulierung, die ein Allergen beinhaltet, kann dazu verwendet werden, eine allergische Erkrankung zu behandeln; eine Formulierung, die ein Autoantigen beinhaltet, kann eine Behandlung für eine Erkrankung, die durch das eigene Immunsystem des Organismus bewirkt wird (z. B. Autoimmunerkrankungen) bereit stellen. Die Erfindung kann therapeutisch verwendet werden, um vorhandene Erkrankungen zu behandeln, schützend, um eine Erkrankung zu verhindern, oder um die Schwere und/oder die Dauer der Erkrankung zu verringern.

[0027] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird eine Auflage zur Verwendung in den obigen Verfahren bereitgestellt. Die Auflage kann einen Verband umfassen und wirksame Mengen von Antigen oder Nukleinsäuren und Adjuvanz. Der Verband kann durchlässig oder undurchlässig sein. Der Verband kann Penetrationsförderer enthalten oder er kann eine Vorrichtung für physische Penetrationsförderung einschließen. Die Auflage kann zusätzliche Antigene einschließen, so dass die Anwendung der Auflage eine Immunantwort gegen mehrere Antigene induziert. In einem solchen Fall können die Antigene, müssen aber nicht, von der gleichen Quelle stammen, aber die Antigene werden unterschiedliche chemische Strukturen haben, so dass sie eine Immunantwort spezifisch für die unterschiedlichen Antigene induzieren. Für eine wirksame Behandlung können mehrere Auflagen in häufigen Intervallen oder konstant über einen Zeitraum angewendet werden.

[0028] Ferner wird in einer weiteren Ausführungsform der Erfindung die Formulierung auf intakter Haut angewendet, die ein Gebiet überdeckt, das von einem Lymphknoten drainiert wird, unter Verwendung von entweder einzelnen oder mehreren Applikationen oder in einer separaten Auflage für Adjuvanz oder Antigen/Nukleinsäure. Die Formulierung kann zusätzliche Antigene enthalten, so dass die Anwendung auf intakter Haut eine Immunantwort gegen mehrere Antigene induziert. In einem solchen Fall können die Antigene, müssen aber nicht, von der gleichen Quelle stammen, aber die Antigene werden unterschiedliche chemische Strukturen ha-

ben, so dass sie eine Immunantwort spezifisch für die unterschiedlichen Antigene induzieren.

[0029] Die Formulierung kann auf der Haut angewendet werden, um die Immunantwort zusammen über andere Wege der Immunisierung aufzufrischen oder zu starten. Daher kann das Starten mit entweder einer einzelnen oder mehreren Anwendungen mit transkutaner Immunisierung gefolgt werden von oralen, nasalen oder parenteralen Techniken zum Auffrischen der Immunisierung mit den gleichen oder veränderten Antigenen. Die Formulierung kann zusätzliche Antigene enthalten, so dass die Anwendung auf intakter Haut eine Immunantwort gegen mehrere Antigene induziert. In einem solchen Fall können die Antigene, müssen aber nicht, von der gleichen Quelle stammen, aber die Antigene werden unterschiedliche chemische Strukturen haben, so dass sie eine Immunantwort spezifisch für die unterschiedlichen Antigen induzieren.

[0030] Zusätzlich zum Antigen und aktivierte Adjuvanz kann die Formulierung ein Vehikel umfassen. Zum Beispiel kann die Formulierung AQUAPHOR® (eine Emulsion aus Rohvaseline, Mineralöl, Mineralwachs, Wollwachs, Panthenol, Bisabolol und Glyzerin), Emulsionen (z. B. wässrige Cremes), Mikroemulsionen, Gele, Öl-in-Wasser-Emulsionen (z. B. ölige Cremes), wasserfreie Lipide und Öl-in-Wasser-Emulsionen, wasserfreie Lipide und Wasser-in-Öl-Emulsionen, Fette, Wachse, Öle, Silikone und Netzmittel (z. B. Glyzerol) umfassen.

[0031] Das Antigen kann von einem Pathogen abgeleitet sein, das den Organismus infizieren kann (z. B. Bakterium, Virus, Pilz oder Parasit) oder von einer Zelle (z. B. Tumorzelle oder normale Zelle) oder von einem Allergen oder einem biologischen Kriegsführungsmittel. Das Antigen kann ein Tumorantigen oder ein Autoantigen sein. Chemisch gesehen kann das Antigen ein Kohlenhydrat, Glykolipid, Glykoprotein, Lipid, Lipoprotein, Phospholipid, Polypeptid oder Fusionsprotein (rekombinant) oder ein chemisches Konjugat davon sein. Das molekulare Gewicht des Antigens kann größer als 500 Daltons sein, vorzugsweise größer als 800 Daltons, und weiter bevorzugt größer als 1000 Daltons.

[0032] Das Antigen kann durch rekombinante Mittel, chemische Synthese oder Aufreinigung aus einer natürlichen Quelle erhalten werden. Ein Vorteil der transkutanen Immunisierung kann darin bestehen, dass eine Aufreinigung eines Antigens nicht notwendig ist, z. B. kann ein gesamter Organismus mit Ultraschall behandelt und zur Immunisierung verwendet werden. Der Grad der Toxizität, die mit der Injektion eines Produkts aus einer solchen Herstellung verbunden ist, ist häufig zu hoch, um toleriert zu werden, wie bei LPS, das tödlich sein kann, wenn es injiziert wird, aber auf der Haut nicht-toxisch ist. Bevorzugt sind proteinartige Antigene oder Konjugate mit Polysaccharid. Das Antigen kann zumindest teilweise in zellfreier Form aufgereinigt werden. Als Alternative kann das Antigen bereitgestellt werden in Form eines lebenden Virus, eines abgeschwächten lebenden Virus oder eines inaktivierten Virus, einem ultraschallbehandelten oder lysierten ganzen Bakterium, eines Parasiten oder eines mit Detergenz behandelten Virus oder einer Fraktion davon.

[0033] Das Einbeziehen eines Adjuvanz kann die Potenzierung oder Modulation der Immunantwort ermöglichen. Darüber hinaus kann die Auswahl eines geeigneten Antigens oder Adjuvanz die bevorzugte Induzierung einer humoralen oder zellulären Immun- oder Mukosaantwort, spezifischer Antikörperisotypen (z. B. IgM, IgD, IgA1, IgA2, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, und/oder IgG4) und/oder spezifische Untergruppen von T-Zellen (z. B. CTL, Th1, Th2 und/oder T_{DTH}) ermöglichen. Wahlweise können Antigen oder Adjuvanz in der Formulierung bereitgestellt werden mittels einer Nukleinsäure (z. B. DNA, RNA, cDNA, cRNA), die das Antigen oder Adjuvanz kodiert, wahlweise mit einem Antigen oder Adjuvanz, das zu der Nukleinsäure hinzugefügt wurde. Diese Technik wird genetische Immunisierung genannt.

[0034] Der Begriff "Antigen" wie in der Erfindung verwendet, soll eine Substanz beschreiben, die eine spezifische Immunantwort induziert, wenn sie den Immunzellen eines Organismus präsentiert wird. Ein Antigen kann ein einzelnes immunogenes Epitop umfassen oder eine Mehrheit von immunogenen Epitopen, die von einem B-Zellrezeptor (d. h. Antikörper auf der Membran der B-Zelle) oder einem T-Zellrezeptor erkannt werden. Ein Molekül kann sowohl ein Antigen als auch ein Adjuvanz (z. B. Choleratoxin) darstellen, und daher kann die Formulierung nur eine Komponente enthalten. Das Antigen kann als ein ganzer Organismus bereitgestellt werden, wie zum Beispiel ein Bakterium oder Virion; das Antigen kann aus einem Extrakt oder Lysat gewonnen werden, entweder von gesamten Zellen oder der Membran allein; oder das Antigen kann chemisch synthetisiert oder durch rekombinante Mittel hergestellt werden.

[0035] Der Begriff "Adjuvanz", wie in der Erfindung verwendet, soll eine Substanz beschreiben, die der Formulierung hinzugefügt wird, um die Induktion einer Immunantwort gegen das Antigen zu fördern.

[0036] Der Begriff "wirksame Menge", wie in der Erfindung verwendet, soll die Menge an Antigen beschreiben, die eine antigenspezifische Immunantwort induziert. Eine solche Induktion einer Immunantwort kann eine Behandlung bereitstellen, wie zum Beispiel Immunschutz, Desensitivierung, Immunsuppression, Modulation von Autoimmunerkrankungen, Potenzierung von Krebsimmunüberwachung oder therapeutische Vakzinierung gegen eine etablierte Infektionserkrankung.

[0037] Unter Epidermis verstehen wir die Zellen der Haut von der Basalschicht aus Keratinozyten oder Basallamina bis zum und durch das Stratum Corneum.

[0038] Die Definition von „transdermal“ wird generell angesehen als: betreffend, sein oder bereitstellen einer Medikation in einer Form für die Absorption durch die Haut in den Blutstrom (~ Wirkstofffreisetzung)(~ Nitroglycerin)(~ Nikotinpflaster). ²Frederick C. Mish et al., Hrsg., Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 10. Aufl.

(Springfield, MA.: Merriam-Webster, Incorporated, 1997), 861.

[0039] Der Begriff „drainierendes Lymphknotenfeld“, wie in der Erfindung verwendet, bezeichnet ein anatomisches Gebiet, aus dem die gesammelte Lymphe durch eine Reihe von definierten Gruppen von Lymphknoten gefiltert wird (z. B. zervikal, axial, inguinal, epitrochlear, popliteal und jene des Abdomen und Thorax).

[0040] Die Hautpenetration kann durch Verwenden von Techniken, welche die Hauthydratation erhöhen, verstärkt werden. Gemäß Roberts und Walker (1993) "ist der Zustand der Hydratation des Stratum Corneum (SC) einer der wichtigsten Faktoren, welche die Rate der perkutanen Absorption einer gegebenen gelösten Substanz bestimmen". Der Zustand der Hydratation wirkt in der Bestimmung der Absorptionsrate einer Substanz durch die Haut mit dem Diffusionsprinzip zusammen. Des Weiteren stellt Hurley fest:

"Es wird angenommen, dass die Absorption von Substanzen durch das Stratum Corneum durch Diffusion gemäß den Fick'schen Gesetzen der Diffusion stattfindet, in denen die Rate der Absorption einer Chemikalie proportional zum Konzentrationsunterschied über der Membran ist. Daher ist ein Konzentrationsgradient zwischen der hohen Konzentration einer gelösten Substanz auf der Hautoberfläche und seinem Fehlen oder geringen Konzentration unterhalb des Stratum Corneum die treibende Kraft in diesem Prozess. Die transcorneale Bewegung der Absorption wird klassisch als "perzellulär" dargestellt, d. h. direkt durch die Zellwände des verdichteten Corneums und nicht intrazellulär. Intrazelluläre Proteinfilamente werden als Wege für polare (wasserlösliche) Bestandteile beschrieben, und das Medium zwischen den Filamenten dient als Weg für nichtpolare (lipidlösliche) Substanzen. (...) Hydratation erhöht die Permeabilität des Stratum Corneum für die meisten Substanzen durch eine Zahl von zytophysiologischen Mechanismen, die noch nicht vollständig geklärt sind."

[0041] Während allgemein bekannt ist, dass Hauthydratation die Hautpenetration verstärkt, sind die Mechanismen, durch die dies stattfindet, nicht vollständig geklärt und waren somit vor der vorliegenden Erfindung nicht vorhersagbar, und es wurde nicht erwartet, dass sie die Penetration von großen Molekülen (7750 Daltons) ermöglichen.

[0042] Die Verwendung von Vehikeln zur Erhöhung der Hydratation ist gut bekannt. Undurchlässige Verbände, wie dampfundurchlässige Plastikfilme (z. B. Polyvinyliden, Polyethylen), verstärken die Absorption im Prinzip durch die erhöhte Hydratation des Stratum Corneum, ein Ergebnis des Anschwellens der Corneozyten, und der Aufnahme von Wasser in die intrazellulären Korridore. Hydrokolloidauflagen können auch dazu verwendet werden, die Hautpenetration zu verstärken. Die Absorption von Steroiden kann unter Verwendung von undurchlässigem Plastikfilm mehr als 100-fach erhöht werden. Im Allgemeinen induzieren Fette, Öle oder undurchlässiges Plastik die meiste Hydratation durch Undurchlässigkeit. Siehe zum Beispiel Idson (1978); Hollingsbee (1995); und McKenzie und Stoughton (1962). Die Verwendung von Hydratation oder eines Vehikels zur Hydratation mit einem Antigen und Adjuvant waren vor unserer Erfindung nicht als Penetration bekannt. Es wurde angenommen, dass die Haut sogar im hydratisierten Zustand auf kleine Moleküle begrenzt ist.

[0043] Geeignete Agentien, von denen bekannt ist, dass sie die Absorption von Wirkstoffen durch die Haut verstärken, sind in Sloan, Use of Solubility Parameters from Regular Solution Theory to Describe Partitioning-Driven Processes, Kap. 5, "Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery" (Marcel Dekker, 1992) und an anderen Stellen im Text beschrieben.

[0044] Es wird erwartet, dass diese Techniken (und andere, die bestimmungsgemäß dazu verwendet werden, den Wirkstofftransfer zu fördern) an Nukleinsäurepräparationen ohne unangemessene Experimente angepasst werden können, wenn der Durchschnittsfachmann sie in den Verfahren der Erfindung verwendet. Spezifische Beispiele, die diese Eignung erläutern, werden unten aufgeführt.

[0045] Der Stand der Technik in der Förderung der Hautpenetration wird beschrieben in Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement, herausgegeben von Kenneth A. Walters und Jonathan Hadgraft, veröffentlicht von Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.

[0046] Die Hautpermeabilität und/oder Hauthydratation kann erwartet werden durch Auswählen eines angemessenen Vehikels aus verschiedenen Klassen, wie Netzmittel (z. B. Glykole, Glyzerole), Pulver (z. B. Kaoline, Schüttellotionen), Öl/Wasser (O/W) Emulsion (z. B. wässrige Cremes), Wasser/Öl Emulsion (z. B. ölige Cremes), emulgierende Grundlage (z. B. wasserfreies Lipid und O/W Emulgatoren), Absorptionsgrundlage (z. B. wasserfreies Lipid und W/O Emulgatoren), Lipophile (z. B. Fette, Wachse, Öle, Silikone) und undurchlässige Verbände (z. B. Plastikfolie).

[0047] Andere Verfahren, die Proteine des Stratum Corneum angreifen, um die Penetration der vorliegenden Erfindung zu verstärken, können angewandt werden. Salizylsäure ist ein Keratinolytikum, das die Absorption erhöhen kann. Harnstoff wirkt sowohl als Keratinolytikum als auch als Hydratisierungsmittel der Haut und kann als Penetrationsförderer wirken. Phospholipase A2 und Phosphatidylcholin-abhängige Phospholipase C können als epidermale Enzyme zur Förderung der Penetration verwendet werden. Andere Penetrationsförderer können Ethanol, Aceton, Detergentien, Basen, Nair®, Propylenglykol, Pyrrolidone, Dimethylacetamid, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Alkylsulfoxid, Phosphinoxid, Tenside und Caprolaktame wie Azon einschließen. Andere Verbindungen, die zur Penetrationsförderung verwendet werden können, schließen Amine und Amide, Alkyl N,N-verteilte Aminoacetate, Decylmethylsulfoxid, Pyrrolidone, Pirotidekane (HPE-101), Benzylalkonium, Benzylalkonium-chlorid-Polymeren, silikonbasierte Polymeren, Fettsäuren, zyklische Harnstoffe, Ter-

pene, Liposome und Cyclodextrine ein. Penetrationsförderer sind im Stand der Technik gut bekannt, zum Beispiel wie beschrieben in Pharmaceutical Penetration Enhancement, (Marcel Dekker, 1993). Andere Techniken, die zur Penetrationsförderung angewendet werden können, schließen Iontophorese, Ultraschall, Elektroporation, die Abrissmethode (engl.: "tape stripping"), die Verwendung von Genkanonen oder anderen Treibmittelvorrichtungen, Zacken, wie für den TB-Zackentest verwendet (wie bereitgestellt durch Mono-Vacc-System), oder Mikronadeln, welche die äußere Oberfläche der Haut durchdringen, oder Scheuermittel, welche die äußeren Schichten der Haut entfernen, und Lipidextraktion ein.

[0048] Eine Vorrichtung, die zum Angreifen des Stratum Corneum verwendet werden kann (die in den USA durch Connaught Laboratories, Inc. aus Swiftwater, PA, vertrieben wird), besteht aus einem Plastikbehälter, der an einem Ende einen Spritzenkolben und am anderen Ende eine Zackenscheibe aufweist. Die Zackenscheibe unterstützt eine Vielzahl von Zacken mit geringem Durchmesser mit einer Länge, welche die oberste Schicht der epidermalen Zellen gerade kratzen wird, aber die Epidermis nicht durchdringt. Jede der Zacken im MONO-VACC® Kit ist mit altem Tuberkulin beschichtet: In der vorliegenden Erfindung kann jede Nadel mit einer pharmazeutischen Zusammensetzung aus Antigen/Nukleinsäure und Adjuvanz beschichtet sein. Die Verwendung der Vorrichtung in der vorliegenden Erfindung kann nicht gemäß den dem Vorrichtungsprodukt beiliegenden schriftlichen Anweisungen des Herstellers erfolgen, weil man bei Verwendung in der vorliegenden Erfindung die Epidermis nicht durchdringt. Hierzu kann die Vorrichtung zum Angriff auf die Oberfläche verwendet werden, um die äußeren Schichten der Haut, das Stratum Corneum und die obere Epidermis anzugreifen, um die transkutane Immunisierung zu verstärken. Ähnliche Vorrichtungen, die ebenfalls in dieser Ausführungsform verwendet werden können, sind jene, die gegenwärtig dazu verwendet werden, Allergietests durchzuführen.

[0049] Andere Ansätze schließen den Angriff auf eine Barriere ein. Die Inhibierung von Cholesterolsynthese unter Verwendung von systemisch verabreichten HMG CoA-Reduktase-Inhibitoren und ähnlichen Wirkstoffen interferieren mit der Barrierefunktion und können eine verstärkte Penetration der Formulierungskomponente ermöglichen.

[0050] Es ist auch vorstellbar, dass die Haut so transformiert wird, dass sie die transkutane Immunantwort verstärkt. CT und LT üben ihre Wirkung über die Gangliosid GM1-Bindung durch die B-Untereinheit aus. Gangliosid GM1 ist ein allgegenwärtiges Zellmembran-Glykolipid, das in allen Säugerzellen gefunden wird. Im gastrointestinalen Trakt bildet sich eine hydrophile Pore, wenn die pentamere CT B-Untereinheit an die Zelloberfläche bindet, was der A-Untereinheit ermöglicht, über die Lipiddoppelschicht einzudringen. Die Haut enthält Ganglioside in einer Konzentration von 30 bis 35 nmol NeuAC/gm. Hautganglioside stellen mögliche Targets für die Initiierung von transkutaner Immunisierung dar, über Mechanismen wie Aktivierung von Langerhanszellen, wie oben beschrieben.

[0051] Ein mögliches Verfahren, um die Haut zu aktivieren zur Verstärkung der Wirkung von transkutaner Immunisierung mit ADP-ribosylierenden Exotoxinen, besteht in der Erhöhung der Anzahl von GM1-Gangliosidmolekülen in Hautzellen. Dies kann durch Aktivierung von Rezeptorzellen unter Verwendung von Sialidase erreicht werden, um Ganglioside, die nicht an das Toxin binden, in die Sialidase-stabilen Choleratoxin-bindenden Ganglioside GGnSLC (Gangliosid GM1) umzusetzen:

„Es ist interessant, dass das Cholera-Vibron wahrscheinlich die am besten bekannte Quelle für Sialidase (oder Neuraminidase, wie sie oft genannt wird), ist. Könnte diese Sialidase eine Rolle in der Naturgeschichte der Erkrankung spielen dadurch, dass sie mehr Rezeptoren für das Toxin zugänglich macht? Wenn dem so ist, sollte jedes aktive Immunisierungsgens der Krankheit ein Anti-Neuraminidase-Element enthalten? Die Inkubation von Darmabschabungen mit Sialidase führt zu einer beträchtlichen Erhöhung in ihrer Fähigkeit, das Toxin zu binden, die nicht nur auf die Umwandlung von Sialidase-labilen Gangliosiden in Choleratoxin-bindende Ganglioside zurückzuführen ist, sondern offenbar auch auf das Freilegen von anderenfalls nicht erreichbaren Gangliosid-Bindungsstellen, möglicherweise durch Abbau von Glykoproteinen. Die Vorbehandlung von Hundedarm mit Sialidase bewirkt, dass er als Antwort auf Choleratoxin mehr Flüssigkeit produziert; die Behandlung von adrenalen Zellen mit Sialidase erhöht deren Ansprechbarkeit auf Choleratoxin; die Vorbehandlung von roten Zellen von Tauben mit Sialidase erhöht in ihnen die Aktivierung der Adenylatcyclase durch Choleratoxin.“

[0052] The biochemistry of cholera, in: Cholera: The American Scientific Experience, 1947– 1980, van Heyningen, W. E., und Seal, J. R., Hrsg., Waterview Press, Boulder, 1983, Seite 263 (Zitate ausgelassen).

[0053] Die Wirkung der Behandlung der Haut mit Sialidase kann die Bindung eines ADP-ribosylierenden Exotoxins wie CT an die Immunzellen verstärken, auf welche die transkutane Immunisierung abzielt. Dies stellt eine Art der Aktivierung der Haut für transkutane Immunisierung dar. Zusätzlich kann Neuraminidase als ein epidermales Enzym wirken, das gleichzeitig die Penetration verstärkt.

[0054] Die Verwendung eines Penetrationsförderers kann in Verbindung mit der Aktivierung der Haut angewandt werden. Die Aktivierung der Haut für transkutane Immunisierung kann auch nach Behandlungen wie dem Betupfen mit Alkohol oder Aceton erfolgen. Es wurde gezeigt, dass das Angreifen der Hautbarriere durch Betupfen der Haut mit Aceton die Dichte der Langerhanszellen um 80% und die Reaktion auf Kontaktallergene in vivo erhöhte. Wenn die Dichte der Langerhanszellen erhöht ist, kann auch die Stärke der Immunantwort erhöht sein. Es kann erwartet werden, dass ein ähnlicher chemischer Angriff die Zahl der Langerhanszellen er-

höht und eine Aktivierung der Hautkomponenten durch transkutanen Immunisierung zur Folge hat durch die Abrissmethode, Natriumdodecylsulfat, die Verwendung von Alkoholtupfern oder eines Enthaarungsmittels wie Kalziumhydroxid. Siehe Proksch und Brasch (1996, 1997) zur Verwendung von Penetrationsförderern und Barriereangriff in allergischer Kontaktdermatitis.

[0055] Die Penetrationsförderung kann auch durch Ausführen von einfachen Aktionen erreicht werden, wie dem Betupfen mit Alkohol unmittelbar vor der Immunisierung, durch gleichzeitige Verwendung von penetrationsfördernden Mitteln und Techniken oder durch Techniken wie das Betupfen mit Aceton 24 Stunden vorher, um die Anzahl der Langerhanszellen zu erhöhen.

[0056] Die Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Formulierung sind im Stand der Technik gut bekannt, wobei das Antigen und Adjuvanz mit einem pharmazeutisch akzeptablen Trägervehikel kombiniert wird. Geeignete Vehikel und ihre Herstellung sind beispielsweise beschrieben in Remington's Pharmaceutical Sciences von E. W. Martin. Solche Formulierungen werden eine wirksame Menge des Antigens und Adjuvanz, zusammen mit einer geeigneten Menge des Vehikels, enthalten, um pharmazeutisch akzeptable Zusammensetzungen herzustellen, die für die Verabreichung an einen Menschen oder ein Tier geeignet sind. Die Formulierung kann angewendet werden in Form einer Creme, Emulsion, Gel, Lotion, Salbe, Paste, Lösung, Suspension oder anderen Formen aus dem Stand der Technik. Insbesondere werden Formulierungen bevorzugt, welche die Hauthydratisierung, -penetration oder beides verstärken. Andere pharmazeutisch akzeptable Zusätze können ebenfalls mit eingeschlossen werden einschließlich beispielsweise Verdünnungsmittel, Trägerbindemittel, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und Farbstoffe.

[0057] Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, sondern nur um eine Erklärung für unsere Beobachtungen bereit zu stellen, wird angenommen, dass das transkutane Immunisierungs-Transfersystem Antigen zu den Zellen des Immunsystems trägt, wo eine Immunantwort induziert wird. Das Antigen kann sich durch die normalen schützenden äußeren Schichten der Haut (d. h. Stratum Corneum) bewegen und die Immunantwort direkt induzieren, oder durch eine Antigen-präsentierende Zelle (z. B. Makrophage, Gewebsmakrophage, Langerhanszelle, dendritische Zelle, dermale dendritische Zelle, B-Lymphozyt oder Kupffer-Zelle), die einem T-Lymphozyten prozessiertes Antigen präsentiert (siehe Stingl et al., 1989; Streilein und Grammer, 1989; Tew et al., 1997). Wahlweise kann sich das Antigen durch das Stratum Corneum über ein Haarfollikel oder eine Hautorganelle (z. B. Schweißdrüse, Fettdrüse) bewegen. Transkutane Immunisierung mit bakteriellen ADP-ribosylierenden Exotoxinen (bAREs) kann auf die epidermale Langerhanszelle abzielen, von der bekannt ist, dass sie zu den effizientesten der Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) gehört. Wir haben herausgefunden, dass bAREs Langerhanszellen aktivieren, wenn sie epikutan in einer Salzlösung auf der Haut angewendet werden. Adjuvantien wie aktiviertes LT können die Aktivierung von Langerhanszellen stark fördern. Die Langerhanszellen steuern spezifische Immunantworten durch Phagozytose des Antigens und Wanderung zu den Lymphknoten, wo sie als APCs wirken, um das Antigen den Lymphozyten zu präsentieren, und induzieren dadurch eine wirksame Antikörper-Antwort. Obwohl die Haut im Allgemeinen als Barriere für eindringende Organismen betrachtet wird, wird die Unvollkommenheit dieser Barriere durch die zahlreichen Langerhanszellen bestätigt, die über die Epidermis verteilt und so gestaltet sind, dass sie die Immunantwort gegen Organismen, die über die Haut eindringen, instrumentieren. Nach Udey (1997):

„Langerhanszellen sind vom Knochenmark abgeleitete Zellen, die in allen geschichteten Plattenepithelien von Säugern vorkommen. Sie umfassen die gesamte akzessorische Zellaktivität, die in nicht entzündeter Epidermis vorhanden ist, und sind im gegenwärtigen Musterbeispiel wesentlich für die Initiierung und Weiterführung von Immunantworten, die gegen epikutan applizierte Antigene gerichtet sind. Langerhanszellen sind Mitglieder einer Familie von wirksamen akzessorischen Zellen („dendritischen Zellen“), die weit verbreitet sind, aber selten in Epithelien und festen Organen oder auch in Lymphgewebe vorkommen.“

[0058] Es wird nun erkannt, dass Langerhanszellen (und vermutlich andere dendritische Zellen) einen Lebenszyklus mit mindestens zwei deutlich unterscheidbaren Stadien aufweisen. Langerhanszellen, die in der Epidermis lokalisiert sind, bilden ein regelmäßiges Netzwerk von Antigen-einfangenden „Wächter“-Zellen. Epidermale Langerhanszellen können Partikel, einschließlich Mikroorganismen, aufnehmen und sind effiziente Prozessierer von komplexen Antigenen. Sie exprimieren jedoch nur geringe Mengen von MHC-Antigenen der Klassen I und II sowie ko-stimulatorischen Molekülen (ICAM-1, B7-1 und B7-2) und sind schlechte Stimulatoren von nicht induzierten T-Zellen. Nach Kontakt mit Antigen werden einige Langerhanszellen aktiviert, treten aus der Epidermis aus und wandern zu T-Zellen-abhängigen Regionen der regionalen Lymphknoten, wo sie sich als reife dendritische Zellen niederlassen. Im Verlauf des Austretens aus der Epidermis und der Wanderung zu den Lymphknoten zeigen Antigen-tragende epidermale Langerhanszellen (nun die „Boten“) dramatische Veränderungen in Morphologie, Oberflächen-Phänotyp und Funktion. Im Gegensatz zu epidermalen Langerhanszellen sind lymphoide dendritische Zellen im Wesentlichen nicht phagozytisch und prozessieren Protein-Antigene ineffizient, aber exprimieren hohe Mengen an MHC-Antigenen der Klassen I und II, sowie verschiedene ko-stimulatorische Moleküle und sind die besten Stimulatoren für naive T-Zellen, die bislang identifiziert wurden.“

[0059] Wir stellen uns vor, dass die wirksamen Antigen-präsentationsfähigkeiten der epidermalen Langerhan-

szellen für transkutane übertragene Vakzinen ausgenutzt werden kann. Eine transkutane Immunantwort unter Verwendung des Hautimmunsystems würde erfordern, dass das Vakzine-Antigen nur den Langerhanszellen im Stratum Corneum (der äußersten Schicht der Haut, bestehend aus verhornten Zellen und Lipiden) über passive Diffusion zugeführt wird und nachfolgende Aktivierung der Langerhanszellen, um das Antigen aufzunehmen, zu B-Zell-Follikeln und/oder T-Zellen-abhängigen Regionen zu wandern und das Antigen den B- und/oder T-Zellen zu präsentieren. Wenn andere Antigene als bAREs (z. B. Diphtherietoxoid) von den Langerhanszellen phagozytiert werden sollen, dann können diese Antigene auch zur Präsentation gegenüber T-Zellen zu den Lymphknoten gebracht werden und nachfolgend eine Immunantwort, die spezifisch für das Antigen ist (z. B. Diphtherietoxoid), induzieren. Daher ist eine Eigenschaft der transkutanen Immunisierung die Aktivierung der Langerhanszelle, vermutlich durch bakterielle ADP-ribosylierende Exotoxine, ADP-ribosylierende Exotoxin-bindende Untereinheiten (z. B. Choleratoxin B-Untereinheit) oder anderen Adjuvanzien oder eine die Langerhanszelle aktivierende Substanz. Es könnte dann erwartet werden, dass die Erhöhung der Hautpopulation von Langerhanszellen unter Verwendung von Strategien wie dem Betupfen mit Aceton die transkutane Immunantwort verstärkt.

[0060] Das Spektrum der allgemein bekannten Hautimmunantworten wird durch Kontaktdermatitis und Atopie repräsentiert. Kontaktdermatitis, eine pathogene Manifestation der LZ-Aktivierung, wird durch Langerhanszellen gesteuert, die Antigen phagozytieren, zu den Lymphknoten wandern, Antigen präsentieren und T-Zellen sensibilisieren, die zur Haut wandern und eine intensive zerstörerische zelluläre Antwort bewirken, die an betroffenen Hautstellen auftritt (Dahl, 1996; Leung, 1997). Die atopische Dermatitis kann die Langerhanszelle in ähnlicher Weise verwenden, wird aber mit Th2-Zellen identifiziert und ist im Allgemeinen mit hohen Mengen von IgE-Antikörpern verbunden (Dahl, 1996; Leung, 1997).

[0061] Die transkutane Immunisierung mit Choleratoxin und verwandten bAREs stellt auf der anderen Seite eine neue Immunantwort ohne oberflächliche und mikroskopische, nach der Immunisierung auftretende Hautauffälligkeiten (d. h. nicht entzündete Haut) dar, wie durch das Fehlen von Lymphozyten-Infiltration 24, 48 und 120 Stunden nach der Immunisierung gezeigt. Dies wird auffallend durch die Vollendung einer Phase-I-Studie gezeigt, in der Menschen mit LT unter einer einfachen, undurchlässigen Auflage immunisiert wurden. Wirksame Anti-LT-IgG und -IgA-Antikörper wurden stimuliert. Zwei Freiwilligen wurden Biopsien an der Stelle der Immunisierung entnommen. Die mikroskopische Auswertung bestätigte die klinische Beobachtung, dass keine Entzündung zu sehen war. Dies legt nahe, dass Langerhanszellen rekrutiert worden sein könnten, die „alle akzessorischen Zellaktivitäten umfassen, die in nicht entzündeter Epidermis vorhanden sind, und die im gegenwärtigen Musterbeispiel essentiell für die Initiierung und Fortführung von Immunantworten sind, die gegen epikutan aufgetragene Antigene gerichtet sind“ (Udey, 1997). Die Einmaligkeit der transkutanen Immunantwort wird hier also sowohl durch die hohen Mengen von antigenspezifischen IgG-Antikörpern als auch durch den Typ des Antikörpers, der produziert wurde (z. B. IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgA), sowie durch das Fehlen von Anti-CT-IgE-Antikörpern angedeutet. Es können jedoch auch andere Immunzellen beteiligt sein, und Spekulationen über den Mechanismus sollten die Erfindung nicht einschränken.

[0062] Wir haben daher herausgefunden, dass von Bakterien abgeleitete Toxine, die auf die Hautoberfläche aufgetragen werden, Langerhanszellen aktivieren können und dass TCI eine wirksame Immunantwort induziert, die sich in hohen Mengen von antigenspezifischen zirkulierenden IgG-Antikörpern äußert, und man würde erwarten, dass eine Verstärkung der Penetration die Immunantwort verstärken würde. Transkutane Adjuvanz und Penetrationsförderer können bei transkutaner Immunisierung verwendet werden, um die IgG-Antikörper oder die T-Zellen-Antwort auf Proteine zu steigern, die sonst selbst nicht immunogen wirken, wenn sie auf der Haut platziert werden.

[0063] Das transkutane Targeting von Langerhanszellen kann auch dazu verwendet werden, ihre Antigen-präsentierende Funktion zu deaktivieren und dadurch eine Immunisierung oder Sensibilisierung zu verhindern. Techniken zum Mobilisieren, sogar negativ Modulieren, von Langerhanszellen oder anderen Hautimmunzellen schließen z. B. die Verwendung von entründungshemmenden, steroidalen oder nicht steroidalen Agentien (NSAID), Cyclophosphamid und anderen Immunsuppressoren, Interleukin-10, TGF β , monoklonalen Antikörpern gegen Interleukin-1, ICE-Inhibitoren oder Verminderung durch Super-Antigene, wie durch *Staphylococcus Enterotoxin-A* (SEA) induzierte epidermale Verminderung von Langerhanszellen, ein.

[0064] Die transkutane Immunisierung kann über die Gangliosid-GM1-Bindungsaktivität von CT, LT oder Untereinheiten wie CTB induziert werden. Gangliosid GM1 ist ein allgegenwärtiges Zellmembran-Glykolipid, das in allen Säugerzellen gefunden wird. Wenn die pentamere CTB-Untereinheit an die Zelloberfläche bindet, wird eine hydrophile Pore gebildet, die der A-Untereinheit erlaubt, über die Lipid-Doppelschicht einzudringen.

[0065] Wir haben gezeigt, dass transkutane Immunisierung durch CT oder CTB Gangliosid-GM1-Bindungsaktivität erfordern kann. Wenn Mäuse transkutan mit CT, CTA und CTB immunisiert werden, ergaben nur CT und CTB eine Immunantwort. CTA enthält die ADP-ribosylierende Exotoxinaktivität, aber nur CT und CTB enthalten die Bindungsaktivität, die fähig ist, eine Immunantwort zu induzieren, was darauf hinweist, dass die B-Untereinheit notwendig und ausreichend war, um durch die Haut zu immunisieren. Wir schließen daraus, dass die Langerhanszelle oder andere Immunzellen durch CTB-Bindung an ihre Zelloberfläche aktiviert werden kann,

aber stärker aktiviert wird durch die gleichzeitige Anwesenheit der A-Untereinheit.

[0066] Zusätzlich zur Aktivierung der Hautkomponente in dem Immunisierungsprozess der vorliegenden Erfindung kann das Antigen und/oder Adjuvanz aktiviert werden, um die Immunisierung zu verstärken. Wenn CT sezerniert wird, findet eine Spaltung an der Trypsin-Erkennungsstelle statt, und das Toxin wird aktiviert. LT jedoch wird mit seiner intakten Trypsin-Erkennungsstelle sezerniert. Wenn LT in den gastro-intestinalen Trakt sezerniert und dadurch gastro-intestinalen Agentien wie Trypsin ausgesetzt wird, werden die proteolytisch sensitiven Reste gespalten, welche die A1- und A2-Untereinheiten von LT verbinden, was der A1-Untereinheit ermöglicht, G-Proteine zu ADP-ribosylieren und dadurch seine toxischen Wirkungen auszuüben. Das Fehlen von Trypsin und verwandten Agentien in der Haut kann eine Trypsinspaltung der proteolytisch sensitiven Reste verhindern, welche die A1- und A2-Untereinheit verbinden, was seine Adjuvanz-Aktivität vermindert.

[0067] Diese beiden bakteriellen Enterotoxine haben viele Eigenschaften gemeinsam. LT und CT haben die gleiche Anzahl und Anordnung von Untereinheiten (A2 : B5) und den gleichen biologischen Wirkmechanismus. Eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von 75–77% wird für beide Ketten gefunden, wenn LT und CT verglichen werden, und der signifikanteste Unterschied tritt in den jeweiligen A-Ketten an Positionen 192–195 auf. An dieser Stelle findet die Spaltung der A-Kette durch Trypsin statt, und die Stelle liegt zwischen zwei Cysteinresten, welche die interne Disulfidbrücke der A-Kette bilden. Siehe z. B. Mekalanos et al., (1979), Spangler (1992) und Sniderman (1995). Wir schlagen vor, dass diese strukturellen Unterschiede zwischen den Molekülen einen signifikanten Einfluss darstellen, nicht nur auf deren enterotoxische Eigenschaften, sondern auch auf ihre Fähigkeit, als Adjuvanzien zu wirken.

[0068] Im Gegensatz zu CT, hergestellt durch *V. cholerae*, ist LT nicht vollständig biologisch aktiv, wenn es zunächst aus der bakteriellen Zelle isoliert wird. Übereinstimmend mit dem A-B-Modell für bakterielle Toxine benötigt LT Trypsinproteolyse und Disulfidreduktion, um voll aktiv zu sein (Sniderman, 1995). Beim Fehlen von proteolytischer Prozessierung ist der enzymatisch aktive A1-Anteil nicht in der Lage, von der A2-Komponente zu dissoziieren, und kann sein Zielsubstrat (Adenylylacyclase) auf der basolateralen Oberfläche der intestinalen Epithelzelle nicht erreichen. Dieser Unterschied in der Aktivierung des isolierten Materials führt zu Unterschieden in den Antwort-Schwellenwerten für LT und CT in biologischen Systemen. Beispielsweise induziert CT nachweisbare Netto-Flüssigkeitssekretion im Mäusedarm bei einer Dosis von 5 bis 10 µg.

[0069] LT induziert in diesem Test eine nachweisbare Netto-Sekretion bei 50 bis 100 µg. Im Kaninchen-„ligated ileal loop“-Test ist der Unterschied dramatischer und eindeutig. Wenn LT proteolytischen Enzymen mit trypsinähnlicher Spezifität ausgesetzt wird, wird das Molekül jedoch bezeichnenderweise in jedem biologischen Testsystem ununterscheidbar von CT (Clements und Finkelstein, 1979; Dickenson und Clements, 1995).

[0070] Nach Spangler (1992, Zitate ausgelassen):

„Die Untereinheit A wird als einzelnes Polypeptid sowohl in *V. cholerae* als auch in *E. coli* synthetisiert. CTA wird proteolytisch zwischen den Resten 192 und 195 „eingekerbt“ während der Sekretion vom Vibron durch *V. cholerae* Hämaggglutinin/Protease, was zwei Polypeptide begründet, A1 (Mr = 28.826) und A2 (Mr = 5.407), die durch eine Disulfidbrücke zwischen den Resten 187 und 199 kovalent miteinander verbunden sind. Im Gegensatz dazu bleibt LT im *E. coli*-Periplasma und wird nicht eingekerbt. Nach Einführen in einen genetisch veränderten Stamm von *V. cholerae* blieb LT ungespalten, obwohl es in der gleichen Weise sezerniert wurde wie CT. Die proteolytische Prozessierung ist daher keine Voraussetzung für Sekretion. Aufgereinigtes LTh kann jedoch in vitro eingekerbt werden, was eher andeutet, dass das mutierte Vibron, das von Hirst et al. verwendet wurde, nicht ausreichend lösliches Hämaggglutinin enthielt, um die Einkerbung zu katalysieren, als eine Unfähigkeit von LTA anzudeuten, eingekerbt werden zu können. CT bleibt ungespalten und in *E. coli* zellassoziiert, wenn es über ein verändertes Plasmid in *E. coli* eingeführt wird. Daher hängt der Defekt in der Prozessierung von CT und LT in *E. coli* mit dem Scheitern von *E. coli* zusammen, eines der Toxine zu spalten und zu sezernieren. Dieser Defekt kann die verringerte Ernsthaftigkeit von *E. coli*-induzierter Darmerkrankung im Vergleich zu Cholera erklären. Sowohl bei CT als auch LT bleibt die Disulfidbindung, die A1 mit A2 verbindet, unreduziert, und das Toxin ist daher im Wesentlichen inaktiv, bis es in eine Zelle eindringt.“

[0071] Sowohl die intakte A1-Untereinheit als auch das Holotoxin sind relativ inaktive ADP-Ribosyltransferasen verglichen mit dem A1-Polypeptid. Katalytische Aktivität erfordert die Reduktion der Disulfidbindung (A1:Cys-187-A2:Cys-199), die A1 und A2 verbindet. Die Spaltung (Einkerbung) zwischen Resten A1-Arg-192 und dem Beginn des A2-Polypeptids bei A2:Met-195 findet während der Sekretion von CT aus dem Vibron statt. Tryptischer Verdau erfüllt diesen Zweck in vitro für LT. Die Reduktion, die CTA1 von CTA2 freigibt, kann durch eine Vielzahl von Agentien erreicht werden, normalerweise Dithiothreitol oder 2-Mercaptoethanol in vitro oder eine Thiol : Proteinoxireductase. Das endogene reduzierende Agens und der Reduktionsmechanismus sind unbekannt. Eine beobachtete, zeitliche Verzögerung von ca. 16 Minuten zwischen dem offensichtlichen Binden des Toxins an den Membranrezeptor und dem ersten Auftauchen des modifizierten Substrats intrazellulär kann mit der Zeit zusammenhängen, die für diesen Schritt, nachfolgend oder während Insertion oder Translokation, erforderlich ist.“

[0072] LTh steht für LT-Holoenzym. Daher erwarten wir, dass, falls trypsinbehandeltes LT für transkutane Immunisierung verwendet werden würde, ähnliche Mechanismen für die Unterbrechung der Disulfidbindungen

aufträten. Dies kann für Trypsinaktivierung von LT gezeigt werden, in der trypsinaktiviertes LT ähnlich wirksam oder von größerer Wirksamkeit im Vergleich mit CT, und von sehr viel größerer Wirksamkeit als unbehandeltes LT im Maus-Y-1-Biotest (siehe Dickinson und Clements, 1995), ist.

[0073] Wir schlagen vor, Komponenten der Formulierung wie LT vor der Anwendung auf der Haut unter Verwendung von Trypsin oder ähnlichen Verbindungen zu aktivieren, um die Ajduvansaktivität und die Immungenität von LT zu verstärken. Man kann auch erwarten, dass die Aktivierung von LT die Immunantwort auf LT als ein Antigen verstärkt. Das aktivierte Adjuvanz für transkutane Immunisierung ist ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins. Wahlweise können Hydratation oder undurchlässige Verbände im transkutanen Transfersystem, zusätzlich zur Aktivierung des Adjuvanz, verwendet werden.

[0074] Zusätzlich weist LT eine ungewöhnliche Affinität zu Kohlenhydrat-enthaltenden Matrices auf. Insbesondere bindet LT an eine Reihe von biologischen Molekülen, die Galaktose enthalten, einschließlich Glycoproteinen und Lipopolysacchariden. Diese lektinähnliche Bindungseigenschaft von LT bewirkt eine breitere Rezeptorverteilung auf Säugerzellen für LT als für CT, das nur an GM1 bindet. Die zwei Moleküle besitzen auch viele immunologische Unterschiede, wie durch Immundiffusionsstudien gegen LT-assoziierte *E. coli*-Diarrhoe in Freiwilligen gezeigt, die B-Untereinheit-Gesamtzell-Cholera-Vakzinen erhielten. LT und CT induzieren unterschiedliche Helfer-T-Zellantworten. Wenn es als Mucosa-Adjuvanz verwendet wird, induziert CT selektiv in einigen Fällen Th2-Typ-Zellen in Payerschen Drüsen und Milzen, was sich in der Produktion von Interleukinen 4 und 5, aber nicht Interleukin 2 oder Gamma-Interferon äußert; während LT sowohl Th1 als auch Th2-Zellen induziert, sowie vorwiegend antigenspezifische IgA-Antworten. Zusammen genommen zeigen diese Ergebnisse, dass LT und CT einzigartige Moleküle sind, trotz ihrer offensichtlichen strukturellen Ähnlichkeiten. Solch ein unterschiedliches Verhalten macht die Fähigkeit, LT zu aktivieren, so dass es eine ähnliche Wirksamkeit wie CT aufweist, nutzbar zur Manipulation des Typs der Immunantwort, die sowohl durch das Toxin selbst hervorgebracht wird als auch gegenüber Antigenen, für die LT als Adjuvanz verwendet werden kann. Es kann auch möglich sein, dass genetisch veränderte Toxide wie Mutanten der Trypsinspaltstelle durch transkutane Immunisierung aktiv sein können. Solch ein mutiertes Toxin kann nützlich sein, weil es die Risiken vermeidet, die mit der Aufnahme oder Inhalieren von nativen Toxinen verbunden sind.

[0075] In einer ähnlichen Weise kann PT aktiviert werden, um seine Adjuvanz- und Antigenaktivitäten zu verstärken. Die S1-Untereinheit des hexameren PT-Proteins enthält die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität während die verbleibenden Untereinheiten die B-Domäne bilden. Ähnlich wie LT, weist PT sowohl Trypsinspaltstellen als auch Disulfidbindungsstellen auf, die eine Rolle in der Assozierung der S1-Untereinheit mit dem B-Oligomer spielen. Es ist vorstellbar, dass die Aktivierung durch Trypsinspaltung, Unterbrechung der Disulfidbindung oder beides die Adjuvanz- und Antigenaktivitäten von PT im Zusammenhang mit transkutaner Immunisierung verstärken. Aktivierung kann auch die Form von Targeting annehmen, die durch Aufbrechen des Hexamers in Untereinheiten erreicht wird. Beispielsweise bindet die PT-Untereinheit S3 ausschließlich an die Glykolipide von Monozyten und könnte dafür verwendet werden, auf Langerhanszellen in der Haut abzuzielen.

[0076] Die Aktivierung des Antigens oder Adjuvanz könnte auf das Konzept der transkutanen Immunisierung unter Verwendung von DNA durch Herstellung eines Fusionsproteins, das Antigen- und Adjuvanzdomänen umfasst, ausgeweitet werden. Mit diesem Verfahren könnte ein Plasmid, das ein ADP-ribosylierendes Exotoxin wie CT oder LT kodiert und so aufgebaut ist, dass es ein separates Antigen wie ein Malaria- oder HIV-Antigen gleichzeitig exprimiert, auf der Haut, in einer hydratisierenden Lösung oder einer undurchlässigen Auflage, platziert und dann durch Langerhanszellen aufgenommen werden. Expression der ADP-ribosylierenden Exotoxinkomponente des Fusionsproteins wie CT oder LT könnte die Langerhanszelle aktivieren, bewirken, dass sie wandert und das Antigen in den Lymphknoten präsentiert, und dadurch gegen das kodierte Antigen eine Immunantwort induzieren. Eine weitere Ausführungsform könnte die Konjugation eines Adjuvanz mit einem Plasmid einschließen: ein Fc-Anteil von IgG an ein Plasmid, um auf APCs abzuzielen. Eine ähnliche Immunisierung könnte durch Verwendung von getrennten Plasmiden für die Expression eines ADP-ribosylierenden Exotoxins wie CT oder LT und einem weiteren für die Expression des Antigens wie ein Malaria- oder HIV-Antigen erreicht werden. Es ist vorstellbar, dass mehrere Gene auf einem einzelnen Konstrukt für mehrere Antigene verwendet werden können, oder es können mehrere Plasmide verwendet werden, um gleichzeitig Antigene für eine multivalente Immunisierung einzubringen. Plasmide, die Choleratoxin B oder andere ADP-ribosylierende Exotoxine kodieren, können mit Protein-Antigenen eingebracht werden.

[0077] Andere Mittel zur Aktivierung des transkutanen Adjuvanz können, wie die Zugabe von Detergenzien und Phospholipid zu der Formulierung wirksam sein, um CT-Aktivität durch den ADP-Ribosylierungsfaktor zu verstärken (siehe z. B. Spangler, 1992).

[0078] Für die Immunisierung unter Verwendung von Adjuvanz- oder Antigenaktivierung kann die Modifizierung der Adjuvanz- oder Antigenkomponente der Formulierung dessen Wirksamkeit in parenteraler Immunisierung reduzieren, ohne dass die Verwendbarkeit der Formulierung für transkutane Immunisierung zerstört wird, wenn das Adjuvanz und/oder Antigen aktiviert ist. Unerwünschte Eigenschaften (z. B. Toxizität, allergische Reaktivität und Nebenwirkungen) des Antigens oder Adjuvanz in der Formulierung können durch Modifi-

kation verringert werden, ohne dass dessen Wirksamkeit in transkutaner Immunisierung zerstört wird. Die Aktivierung eines solchen modifizierten Adjuvanz oder Antigens kann z. B. die Entfernung einer reversiblen chemischen Modifikation (z. B. Proteolyse) oder eine Beschichtung, die eine Komponente der Formulierung reversibel vom Immunsystem isoliert (d. h. eine eingekapselte Formulierung), einschließen. Alternativ können das Adjuvanz und/oder Antigen, das die Formulierung umfasst, in einem Partikel eingekapselt sein (z. B. Mikrosphären, Nanopartikel). Die Phagozytose des Partikels selbst kann die Aktivierung einer Antigen-präsentierenden Zelle durch Hochregulieren der Expression von Haupthistokompatibilitäts-Antigenen und/oder ko-stimulativen Molekülen (z. B. MHC Klasse II, B7-2) verstärken.

ANTIGEN

[0079] In der Erfindung verwendetes Antigen kann durch rekombinante Mittel exprimiert werden, vorzugsweise als eine Fusion mit einem Affinitäts- oder Epitop-Tag (Summers und Smith, 1987; Goeddel, 1990; Ausubel et al., 1996); die chemische Synthese eines Oligopeptids, entweder frei oder konjugiert an Trägerproteine, kann verwendet werden, um Antigen zu erhalten, das in der Erfindung verwendet wird (Bodanszky, 1993; Wisdom, 1994). Oligopeptide werden als eine Art Polypeptid betrachtet. Oligopeptidlängen von 6 Resten bis 20 Resten sind bevorzugt. Polypeptide können auch als verzweigte Strukturen synthetisiert werden, wie solche, die in den US-Patenten Nr. 5,229,490 und 5,390,111 offenbart werden. Antogene Polypeptide schließen zum Beispiel ein: synthetische oder rekombinante B-Zell- und T-Zell-Epitope, Universal-T-Zell-Epitope und gemischte T-Zell-Epitope aus einem Organismus oder einer Erkrankung, und B-Zell-Epitope von einem/r anderen. Antigen, das durch rekombinante Mittel oder Peptidsynthese erhalten wurde, wie auch in der Erfindung verwendetes Antigen, das aus natürlichen Quellen oder Extrakten erhalten wurde, kann mittels der physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Antigens aufgereinigt werden, vorzugsweise durch Fraktionierung oder Chromatographie (Janson und Ryden, 1989; Deutscher, 1990, Scopes 1993). Eine multivalente Antigenformulierung kann verwendet werden, um eine Immunantwort gegen mehr als ein Antigen zur gleichen Zeit zu induzieren. Konjugate können verwendet werden, um eine Immunantwort gleichzeitig gegen mehrere Antigene zu induzieren, um die Immunantwort aufzufrischen oder für beides. Zusätzlich können Toxine durch die Verwendung von Toxoiden aufgefrischt werden oder Toxide durch die Verwendung von Toxinen. Transkutane Immunisierung kann verwendet werden, um Antworten aufzufrischen, die ursprünglich durch andere Wege der Immunisierung induziert worden waren, wie durch orale, nasale oder parenterale Wege. Antigen schließt zum Beispiel ein: Toxine, Toxide, Untereinheiten davon oder Kombinationen davon (z. B. Cholera toxin, Tetanustoxoid); zusätzlich können Toxine, Toxide und Untereinheiten davon oder Kombinationen davon als Antigen und Adjuvanz wirken.

[0080] Das Antigen kann in einem Puffer aufgelöst werden. Geeignete Puffer schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf phosphatgepufferte Salzlösung, $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -frei (PBS), normale Salzlösung (150 mM NaCl in Wasser) und Trispuffer. Glycerol kann ein geeigneter nicht-wässriger Puffer für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung sein. Das Antigen kann auch in Suspension vorliegen. Das Detergens kann in der Immunisierungslösung bleiben, um die Penetration zu verstärken.

[0081] Hydrophobes Antigen kann in einem Detergens aufgelöst werden, zum Beispiel ein Polypeptid, das eine membrandurchspannenden Domäne enthält. Des Weiteren kann für Formulierungen, die Liposome enthalten, ein Antigen in einer Detergenslösung (z. B. ein Zellmembranextrakt) mit Lipiden gemischt werden, und Liposome können dann durch Entfernen des Detergens durch Verdünnung, Dialyse oder Säulenchromatographie gebildet werden, siehe Gregoriadis (1993). Bestimmte Antigene, wie zum Beispiel solche eines Virus (z. B. Hepatitis A), müssen als solche nicht löslich sein, sondern können direkt in eine Lipidmembran eingebaut werden (z. B. ein Virosom, wie beschrieben durch Morein und Simons, 1985), in eine Suspension eines Virions allein oder Suspensionen von Mikrosphären, Nanopartikeln oder hitze-inaktivierten Bakterien, die durch Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen und aktiviert werden können (z. B. Opsonisation).

[0082] Plotkin und Mortimer (1994) stellen Antigene bereit, die dazu verwendet werden können, Tiere oder Menschen zu vakzinieren, um für bestimmte Pathogene eine spezifische Immunantwort zu induzieren, wie auch Verfahren zur Herstellung von Antigen, Bestimmung einer geeigneten Dosis von Antigen, Testen auf die Induktion einer Immunantwort und Behandeln von Infektionen durch ein Pathogen (z. B. Bakterium, Virus, Pilz oder Parasit).

[0083] Bakterien schließen zum Beispiel ein: Anthrax, Campylobacter, Cholera, Clostridia, Diphtherie, entero-toxigene E. coli, Giardia, Gonococcus, Helicobacter pylori oder Unease, produziert durch H. pylori (Lee und Chen, 1994), Hämophilus influenza B, Hämophilus influenza nicht typisierbar, Meningococcus, Mycobakterium, Pertussis, Pneumococcus, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus B, Tetanus, Vibrio cholerae, Borrelia burgdorfi und Yersinia; und deren Produkte.

[0084] Viren schließen zum Beispiel ein: Adenovirus, Dengue Serotypen 1 bis 4 (Delenda et al., 1994; Fonseca et al., 1994; Smucny et al., 1995), Ebola (Jahrling et al., 1996), Enterovirus, Hantavirus, Hepatitis Serotypen A bis E (Blum, 1995; Katkov, 1996; Lieberman und Greenberg, 1996; Mast, 1996; Shafara et al., 1995;

Smedila et al., 1994; US-Patent Nr. 5,314,808 und 5,436,126), Herpes simplex Virus 1 oder 2, menschliches Immundefizienzvirus (Deprez et al., 1996), menschliches Papillomvirus, Influenza, Masern, Norwalk, japanische Pferdeenzephalitis, Papillomvirus, Parvovirus B19, Polio, Tollwut, Respiratory Syncytial Virus, Rotavirus, Röteln, Rubeola, St. Louis Enzephalitis, Vaccinia, Vacciniakonstrukte, die Gene enthalten, die andere Antigene wie Malaria-Antigene, Varizella und Gelbfieber kodieren; und deren Produkte.

[0085] Parasiten schließen zum Beispiel ein: *Entamoeba histolytica* (Zhang et al., 1995); *Plasmodium* (Bathurst et al., 1993; Chang et al., 1989, 1992, 1994; Fries et al., 1992a, 1992b; Herrington et al., 1991; Khusmith et al., 1991; Malik et al., 1991; Migliorini et al., 1993; Pessi et al., 1991; Tam, 1988; Vreden et al., 1991; White et al., 1993; Wiesmüller et al., 1991), *Leishmania* (Frankenburg et al., 1996) und die Darmwürmer; und Produkte davon.

[0086] Andere Viren, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden in Gordon, 1997, offenbart und schließen zum Beispiel ein: Adenovirus (Atemwegserkrankung), Coronavirus (Atemwegs- und Darmerkrankung), Cytomegalovirus (Mononukleose), Dengue-Virus (Dengue-Fieber, Schocksyndrom), Epstein-Barr-Virus (Mononukleose, Burkitt-Lymphom), Hepatitis A-, B- und C-Virus (Lebererkrankung), Herpes simplex Virus Typ 1 (Enzephalitis, Stomatitis), Herpes simplex Virus Typ 2 (Genitalschäden), menschliches Herpesvirus 6 (unbekannt, möglicherweise Kaposi Sarkom), menschliches Immundefizienzvirus Typen 1 und 2 (erworbenes Immundefizienzsyndrom AIDS), menschliches T-Zell-lymphotropes Virus Typ 1 (T-Zell-Leukämie), Influenza A, B und C (Atemwegserkrankung), japanisches Enzephalitisvirus (Lungenentzündung, Enzephalopathie), Masernvirus (subakute sklerotisierende Leukoenzephalitis), Mumpsvirus (Meningitis, Enzephalitis), Papillomvirus (Warzen, Zervixkarzinom), Parvovirus (Atemwegserkrankung, Anämie), Poliovirus (Lähmung), Polyomavirus JC (multifokale Leukoenzephalopathie), Polyomavirus BK (hämorrhagische Zystitis), Rabiesvirus (Nervenfehlfunktion), Respiratory Syncytial Virus (Atemwegserkrankung), Rhinovirus (einfache Erkältung), Rotavirus (Diarrhoe), Rubellavirus (fötale Missbildungen), Vacciniavirus (allgemeine Infektion), Gelbfiebervirus (Gelbsucht, Nieren- und Leberversagen) und Varizella zoster Virus (Windpocken).

[0087] Andere Bakterien, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden in Gordon, 1997, offenbart und schließen zum Beispiel ein: *Bacillus anthracis* (Anthrax), *Bordetella pertussis* (Keuchhusten), *Borrelia burgdorferi* (Lyme-Borreliose), *Campylobacter jejuni* (Gastroenteritis), *Chlamydia trachomatis* (entzündliche Beckenerkrankung, Blindheit), *Clostridium botulinum* (Botulismus), *Corynebacterium diphtheriae* (Diphtherie), *Escherichia coli* (Diarrhoe, Harntraktinfektionen), *Hämophilus influenzae* (Lungenentzündung), *Helicobacter pylori* (Gastritis, Zwölffingerdarmgeschwür), *Legionella pneumophila* (Legionärskrankheit), *Listeria monocytogenes* (Meningitis, Sepsis), *Mycobacterium leprae* (Lepra), *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose), *Neisseria gonorrhoea* (Gonorrhoea), *Neisseria meningitidis* (Sepsis, Meningitis), *Pseudomonas aeruginosa* (im Krankenhaus entstehende Infektionen), *Rickettsia* (Rocky-Mountain-Fleckfieber), *Salmonella* (typhusartiges Fieber, Gastroenteritis), *Shigella* (Dysenterie), *Staphylococcus aureus* (Eiterflechte, toxisches Schocksyndrom), *Streptococcus pneumoniae* (Lungenentründung, Mittelohrenentründung), *Streptococcus pyogenes* (rheumatisches Fieber, Rachenkatarrh), *Treponema pallidum* (Syphilis), *Vibrio cholerae* (Cholera), *Yersinia pestis* (Beulenpest).

[0088] Andere Parasiten, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden in Gordon, 1997, offenbart und schließen zum Beispiel ein: afrikanische Trypanosomen (Schlafkrankheit), *Entamoeba histolytica* (amöbe Dysenterie), *Giardia lamblia* (Durchfallerkrankung), *Leishmania* (Schäden der Milz, tropische Geschwüre), *Plasmodium* (Malaria), *Microfilariae* (Fadenwürmerbefall), *Schistosomen* (Bilharziose), *Toxoplasma gondii* (Toxoplasmose), *Trichomonas vaginalis* (Vaginitis), *Trypanosoma cruzi* (Chagas Krankheit).

[0089] Pilze, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden in Gordon, 1997, offenbart und schließen zum Beispiel ein: *Candida albicans* (Schleimhautinfektionen), *Histoplasma* (Lungen- und Lymphknoteninfektionen), *Pneumocystis carinii* (Lungenentründung bei AIDS), *Aspergillus fumigatus* (Aspergillose).

ADJUVANZ

[0090] Die Formulierung enthält auch ein Adjuvant, einschließlich eines ADP-ribosylierenden Exotoxins, dessen bindende B-Untereinheit oder Toxoid eines ADP-ribosylierende Exotoxins, wobei ein einzelnes Molekül sowohl Adjuvant- als auch Antigeneigenschaften (z. B. Choleratoxin) (Elson und Dertzbaugh, 1994) enthalten kann. Adjuvanten sind Substanzen, die dafür verwendet werden können, spezifisch oder unspezifisch eine antigenspezifische Immunantwort zu potenzieren. Normalerweise werden das Adjuvant und die Formulierung vor der Präsentation des Antigens gemischt, aber als Alternative können sie innerhalb eines kurzen Zeitintervalls getrennt präsentiert werden.

[0091] Choleratoxin ist ein bakterielles Exotoxin aus der Familie der ADP-ribosylierenden Exotoxine (bezeichnet als bAREs). Die meisten bAREs sind als A : B-Dimere mit einer bindenden B-Untereinheit und einer A-Untereinheit, welche die ADP-Ribosyltransferase enthält, organisiert. Solche Toxine schließen Diphtherie, *Pseudomonas*-Exotoxin A, Choleratoxin (CT), *E. coli* hitrelabiles Enterotoxin (LT), Pertussistoxin (PT), *C. botuli-*

num-Toxin C2, C. botulinum-Toxin C3, C. limosum-Exoenzym, B. cereus-Exoenzym, Pseudomonas-Exotoxin S, Staphylococcus aureus EDIN und B. sphaericus-Toxin ein.

[0092] Choleratoxin ist ein Beispiel für ein bARE, das mit A- und B-Untereinheiten organisiert ist. Die B-Untereinheit ist die bindende Untereinheit und besteht aus einem B-Untereinheit-Pentamer, das nicht-kovalent an die A-Untereinheit gebunden ist. Das B-Untereinheit-Pentamer ist in einer symmetrischen Doughnut-förmigen Struktur angeordnet, die an ein GM1-Gangliosid auf der Zielzelle bindet. Die A-Untereinheit dient zum ADP-Ribosylieren der Alpha-Untereinheit eines Teils der heterodimeren GTP-Proteine (G-Proteine), einschließlich des Gs-Proteins, was zu einer erhöhten intrazellulären Menge von zyklischem AMP führt. Dies stimuliert die Freisetzung von Ionen und Flüssigkeit aus intestinalen Zellen im Fall von Cholera.

[0093] Choleratoxin (CT) und seine B-Untereinheit (CTB) haben Adjuvanzeigenschaften, wenn sie entweder als ein intramuskuläres oder orales Immunogen verwendet werden (Elson und Dertzbaugh, 1994; Trach et al., 1997). Hitzelabiles Enterotoxin aus *E. coli* (LT) ist zu 75– 77% mit CT auf der Aminosäurebene homolog und besitzt ähnliche Bindungseigenschaften; es scheint ebenfalls an den GM1-Gangliosid-Rezeptor im Darm zu binden und hat ähnliche ADP-ribosylierende Exotoxinaktivitäten. Ein weiteres bARE, Pseudomonas Exotoxin A (ETA) bindet an das α 2-Makroglobulinrezeptor-Low-Density-Lipoproteinrezeptorverwandte Protein (Kounnas et al., 1992). bAREs sind in einem Übersichtsartikel von Krueger und Barbieri (1995) beschrieben. CT, CTB, LT, ETA und PT stellen, obwohl sie unterschiedliche zelluläre Bindungsstellen aufweisen, wirksame Adjuvantien für transkutane Immunisierung dar, die hohe Mengen von IgG-Antikörpern, nicht aber IgE-Antikörpern, induzieren. CTB ohne CT kann ebenfalls hohe Mengen von IgG-Antikörpern induzieren. Daher können sowohl bAREs als auch deren Derivate wirksam immunisieren, wenn sie epikutan in einer einfachen Lösung auf die Haut aufgebracht werden.

[0094] Alle lizenzierten Vakzinien erfordern einen Antikörperspiegel für die Zulassung – es wird keine andere Immunkomponente, wie T-Zell-Proliferation, verwendet. Schutz gegen die lebensbedrohlichen Infektionen, Diphtherie, Pertussis und Tetanus (DPT), kann durch Induzieren von hohen Mengen von zirkulierenden Antitoxin-Antikörpern erreicht werden. Pertussis kann dahingehend eine Ausnahme sein, dass einige Forscher glauben, dass Antikörper, die gegen andere Teile des eindringenden Organismus gerichtet sind, für den Schutz notwendig sind, obwohl dies kontrovers ist (siehe Schneerson et al., 1996) und die meisten azellulären Pertussivakzinien der neuen Generation PT als eine Komponente der Vakzine aufweisen (Krueger und Barbieri, 1995). Die Pathologien in den Erkrankungen, die durch DPT verursacht werden, hängen direkt mit der Wirkung ihrer Toxine und Antitoxin-Antikörper zusammen und spielen mit Sicherheit eine Rolle für den Schutz (Schneerson et al., 1996).

[0095] Im Allgemeinen können Toxine chemisch inaktiviert werden, um Toxide zu bilden, die weniger toxisch sind aber immunogen bleiben. Wir stellen uns vor, dass eine Ausführungsform des transkutanen Immunisierungssystems toxinbasierte Immunogene und Adjuvantien verwenden wird, um Antitoxinspiegel zu erzielen, die adäquat für den Schutz gegen diese Erkrankungen sind. Die Antitoxin-Antikörper können durch Immunisierung mit den Toxinen, den genetisch detoxifizierten Toxoiden selbst oder mit Toxoiden und Adjuvantien wie CT induziert werden. Man kann sich vorstellen, dass genetisch toxoidierte Toxine, die veränderte ADP-ribosylierende Exotoxinaktivität aufweisen, oder Trypsinspaltstellenmutationen oder andere Mutationen als nicht-toxische Aktivatoren von Antigen-präsentierenden Zellen, die in transkutaner Immunisierung verwendet werden, besonders nützlich sind. Mutanten basierend auf der Inaktivierung der katalytischen Aktivität der ADP-Ribosyltransferase durch genetische Deletion behalten die Bindungsfähigkeiten aber ihnen fehlt die Toxizität der natürlichen Toxine. Dieser Ansatz wird von Burnette et al. (1994), Rappouli et al. (1995) und Rappouli et al. (1996) beschrieben. Solche genetisch toxoidierten Exotoxine könnten für ein transkutanes Immunisierungssystem insoweit verwendbar sein, als dass sie keine Sicherheitsbedenken hervorrufen würden, weil die Toxide als nicht toxisch angesehen würden. Es gibt andere genetisch veränderte Toxine, die zum Beispiel eine Deletion der Trypsinspaltstelle aufweisen, und sowohl nicht toxische als auch immunogene auf der Haut verwenden. Man würde jedoch erwarten, dass die Aktivierung durch eine Technik wie Trypsinspaltung, die Adjuvanzqualitäten von LT durch die Haut erhöht, der eigenen Trypsinenzyme fehlen. Zusätzlich existieren mehrere Techniken, um Toxine chemisch zu toxoidieren, wodurch das gleiche Problem angegangen werden kann (Schneerson et al., 1996). Diese Techniken könnten für bestimmte Anwendungen wichtig sein, insbesondere pädiatrische Anwendungen, bei denen in den Verdauungsapparat aufgenommene Toxine (z. B. Diphtherietoxin) möglicherweise schädliche Reaktionen hervorrufen können.

[0096] Wenn ein immunisierendes Antigen ausreichende Langerhanszellen-aktivierende Fähigkeiten aufweist, dann muss ein getrenntes Adjuvanz nicht erforderlich sein, wie im Fall von CT, das sowohl Antigen als auch Adjuvanz darstellt. Es ist vorgesehen, dass Gesamtzellpräparationen, lebende Viren, abgeschwächte Viren, DNA-Plasmide und bakterielle DNA zur transkutanen Immunisierung ausreichend sein können, wenn ein Adjuvanz vorhanden ist. Es kann möglich sein, geringe Konzentrationen von Kontaktensensibilisatoren oder anderen Aktivatoren von Langerhanszellen zu verwenden, um eine Immunantwort zu induzieren, ohne Hautschäden zu induzieren.

PRAKТИСHE ASPEКTE DER TRANSKUTANEN IMMUNISIERUNG

[0097] Eine wirksame Immunisierung kann mit der vorliegenden Erfindung erreicht werden, weil transkutaner Transfer von Antigen auf die Langerhanszelle abzielen kann. Diese Zellen werden im Überfluss in der Haut gefunden und sind wirksame Antigen-präsentierende Zellen, die zu T-Zell-Gedächtnis und wirksamen Immunantworten führen. Durch die Anwesenheit einer großen Zahl von Langerhanszellen in der Haut kann die Effizienz des transkutanen Transfers mit dem Oberflächenareal zusammenhängen, das dem Antigen und Adjuvanz ausgesetzt war. Tatsächlich kann der Grund dafür, dass transkutane Immunisierung so effizient ist, darin liegen, dass sie auf eine größere Zahl von diesen wirksamen Antigen-präsentierenden Zellen abzielt als intramuskuläre Immunisierung.

[0098] Wir sehen vor, dass die vorliegende Erfindung den Zugang zur Immunisierung verbessern wird, während eine wirksame Immunantwort induziert wird. Da transkutane Immunisierung keine physikalische Durchdringung der Haut und daraus resultierende Komplikationen und Schwierigkeiten beinhaltet, werden die Erfordernisse an geschultem Personal, sterilen Techniken und steriler Ausrüstung verringert. Des Weiteren werden die Hindernisse für Immunisierung an mehreren Stellen oder für mehrere Immunisierungen verringert. Immunisierung durch eine einzelne Anwendung der Formulierung ist ebenfalls vorgesehen, aber Auffrischen wird im Allgemeinen nötig sein. Die nadelfreie Immunisierung ist eine Priorität für die Weltgesundheitsorganisation (WHO) wegen der Wiederverwendung von Nadeln, was nadelbedingte Erkrankung bewirkt.

[0099] Eine Immunisierung kann erzielt werden durch Verwenden von epikutaner Anwendung einer einfachen Lösung von Antigen und Adjuvanz, imprägniert in Gaze unter einer undurchlässigen Auflage oder durch Verwenden von anderen Auflagetechnologien: Cremes, Gels, Immersionen, Salben und Sprays sind andere mögliche Verfahren der Anwendung. Die Immunisierung könnte durch nicht geschultes Personal verabreicht werden und ist der Eigenanwendung zugänglich. Eine Feldimmunisierung könnte in großem Maßstab stattfinden angesichts des einfachen Zugangs zur Immunisierung. Zusätzlich würde ein einfaches Immunisierungsverfahren den Zugang zur Immunisierung durch pädiatrische Patienten und ältere Menschen und den Bevölkerungen in Ländern der Dritten Welt verbessern.

[0100] Bei früheren Vakzinien wurden ihre Formulierungen durch die Haut mit Nadeln injiziert. Injektion von Vakzinien unter Verwendung von Nadeln bringt bestimmtem medizinischen Personal, um die Vakzinien zu verabreichen, Unbehagen durch die Injektion und mögliche Komplikationen, die das Punktieren der Haut mit der Nadel mit sich bringt. Die Immunisierung durch die Haut ohne die Verwendung von Nadeln (d. h. transkutane Immunisierung) stellt durch Vermeiden der zuvor erwähnten Nachteile einen wichtigen Fortschritt für den Vakzinetransfer dar.

[0101] Darüber hinaus kann transkutane Immunisierung der Immunisierung unter Verwendung von Nadeln überlegen sein, da mehr Immunzellen erreicht werden würden durch die Verwendung von mehreren Stellen, die auf große Oberflächenbereiche der Haut abzielen. Eine therapeutisch wirksame Menge von Antigen, die ausreichend ist, um eine Immunantwort zu induzieren, kann transkutan eingebracht werden, entweder an einer einzelnen kutanen Stelle oder über ein Gebiet von intakter Haut, das mehrere drainierende Lymphknotenfelder abdeckt (z. B. cervical, axial, inguinal, epitrocheal, popliteal und jene des Abdomen und Thorax). Solche Gebiete in der Nähe von vielen unterschiedlichen Lymphknoten, an Stellen überall auf dem Körper, werden dem Immunsystem einen weiter verbreiteten Stimulus bieten, als wenn eine geringe Menge von Antigen an einer einzelnen Stelle durch intradermale, subkutane oder intramuskuläre Injektion injiziert wird.

[0102] Antigen, das durch oder in die Haut wandert, kann Antigen-präsentierenden Zellen begegnen, die das Antigen in einer Weise prozessieren, dass eine Immunantwort induziert wird. Mehrere Immunisierungsstellen können eine größere Zahl von Antigen-präsentierenden Zellen rekrutieren und die größere Population von rekrutierten, Antigen-präsentierenden Zellen würde zu einer stärkeren Induktion der Immunantwort führen. Es ist vorstellbar, dass die Absorption durch die Haut Antigen zu phagozytischen Zellen der Haut bringt, wie zum Beispiel dermalen dendritischen Zellen, Makrophagen und anderen Antigen-präsentierenden Zellen der Haut; Antigen kann auch zu phagozytischen Zellen der Leber, Milz und des Knochenmarks gebracht werden, von denen bekannt ist, dass sie als die Antigen-präsentierenden Zellen dienen, durch den Blutstrom oder das lymphatische System. Langerhanszellen, dendritische Zellen und Makrophagen können spezifisch gezielt angegriffen werden, unter Verwendung von Fc-Rezeptor, konjugiert mit Adjuvanz oder rekombinant hergestellt als Fusionsprotein; außerdem können Komplementrezeptoren (C3, C5) an Protein A oder Protein G konjugiert werden oder als Fusionsprotein rekombinant hergestellt werden, um auf das Oberflächenimmunglobulin von B-Zellen abzuzielen. Das Ergebnis wäre eine gezielte Verteilung von Antigen auf Antigen-präsentierende Zellen in einem Ausmaß, das selten, wenn überhaupt, durch gegenwärtige Immunisierungspraktiken erreicht wird.

[0103] Das transkutane Immunisierungssystem kann direkt auf die Haut aufgebracht werden und an der Luft getrocknet werden; in die Haut oder die Kopfhaut eingerieben werden; an der Stelle mit einem Verband, einer Auflage oder absorbierendem Material festgehalten werden; Eintauchen; auf andere Weise festgehalten werden, durch eine Vorrichtung wie einen Strumpf, Pantoffel, Handschuh oder Hemd; oder auf die Haut gesprüht werden, um den Kontakt mit der Haut zu maximieren. Die Formulierung kann in einem absorbierenden Ver-

band oder Gaze angewendet werden. Die Formulierung kann mit einem undurchlässigen Verband bedeckt werden, wie zum Beispiel AQUAPHOR® (eine Emulsion von Rohpetroleum, Mineralöl, Mineralwachs, Wollwachs, Panthenol, Bisabolol und Glyzerin von Beiersdorf, Inc.), Plastikfolie, COMFEEL® (Coloplast) oder Vaseline; oder einem undurchlässigen Verband wie z. B. DUODERM® (3M) oder OPSITE® (Smith & Nephew). Ein undurchlässiger Verband verhindert vollständig das Durchdringen von Wasser. Die Formulierung kann auf eine einzelne oder mehrere Stellen, einzelne oder mehrere Gliedmaßen oder auf große Oberflächenbereiche der Haut durch vollständiges Eintauchen aufgetragen werden. Die Formulierung kann direkt auf die Haut aufgebracht werden.

[0104] Die genetische Immunisierung wurde in den US-Patenten Nr. 5,589,466, 5,593,972 und 5,703,055 beschrieben. Die in der Formulierung enthaltene(n) Nukleinsäure(n) kann (können) das Antigen, das Adjuvant oder beide kodieren. Es würde im Allgemeinen erwartet werden, dass die Immunantwort durch die gemeinsame Verabreichung von einem Adjuvant, zum Beispiel CT, LT oder CpGs, gegenüber der Nukleinsäure, die das Antigen kodiert, verstärkt werden würde. Die Nukleinsäure kann, muss aber nicht, fähig sein zur Replikation; sie kann nicht integrierend und nicht infektiös sein. Zum Beispiel kann die Nukleinsäure ein Fusionspolypeptid kodieren, umfassend das Antigen und eine Ubiquitindomäne, um die Immunantwort auf eine Klasse I beschränkte Antwort zu richten. Die Nukleinsäure kann weiterhin eine regulatorische Region umfassen (z. B. Promotor, Enhancer, Silencer, Transkriptionsinitiations- und -terminationsstellen, RNA-Splice Akzeptor- und Donorstellen, Polyadenylierungssignal, interne Ribosomenbindungsstelle, Translationsinitiations- und -terminationsstellen), die funktionell verknüpft sind mit den Sequenzen, die das Antigen kodieren. Die Nukleinsäure kann mit einem Agens komplexiert werden, das die Transfektion fördert, wie einem kationischen Lipid, Kalziumphosphat, DEAE-Dextran, Polybren-DMSO oder einer Kombination davon; auch können Immunzellen direkt angegangen werden, durch Konjugation von DNA an den Fc-Rezeptor oder Protein A/G, oder Einkapseln der DNA in ein Agens, das mit Fc-Rezeptor oder Protein A/G verknüpft ist. Die Nukleinsäure kann Regionen umfassen, die von viralen Genomen abgeleitet sind. Solche Materialien und Methoden sind von Kriegler (1990) und Murray (1991) beschrieben worden.

[0105] Eine Immunantwort kann humorale (d. h. antigenspezifische Antikörper) und/oder zelluläre (d. h. antigenspezifische Lymphozyten wie B-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, CTL, Th1-Zellen, Th2-Zellen und/oder T_{DTH}-Zellen) Wirkungszweige umfassen. Darüber hinaus kann die Immunantwort NK-Zellen umfassen, die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) vermitteln.

[0106] Die Immunantwort, die durch die erfindungsgemäß hergestellte Formulierung induziert wird, kann das Hervorrufen von antigenspezifischen Antikörpern und/oder zytotoxischen Lymphozyten (CTL, beschrieben in einem Übersichtsartikel von Alving und Wassef, 1994) umfassen. Antikörper können durch Immunoassaytechniken nachgewiesen werden, und der Nachweis von verschiedenen Isotypen (z. B. IgM, IgD, IgA1, IgA2, sezerniertes IgA, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 oder IgG4) kann erwartet werden. Eine Immunantwort kann auch durch einen Neutralisierungstest festgestellt werden. Antikörper sind schützende Proteine, die durch B-Lymphozyten produziert werden. Sie sind hochspezifisch und zielen im Allgemeinen auf ein Epitop eines Antigens ab. Häufig spielen Antikörper eine Rolle beim Schutz gegen Erkrankungen, durch spezifisches Reagieren mit Antigenen, die von den Pathogenen abgeleitet sind, welche die Erkrankung bewirken.

[0107] CTLs sind besonders schützende Immunzellen, die produziert werden, um gegen die Infektion durch ein Pathogen zu schützen. Sie sind ebenfalls hochspezifisch. Die Immunisierung kann CTLs spezifisch für das Antigen induzieren, so wie ein synthetisches Oligopeptid, basierend auf einem Malariaprotein, in Verbindung mit einem Eigen-Haupthistokompatibilitäts-Antigen. CTLs, die durch Immunisierung mit dem transkutanen Transfersystem induziert wurden, können Pathogen-infizierte Zellen abtöten. Die Immunisierung kann auch eine Gedächtnisantwort hervorrufen, wie nahegelegt wird durch die Auffrischungs-Antworten in Antikörpern und CTLs, Lymphozytenproliferation durch Kultur von Lymphozyten, die mit Antigen stimuliert wurden und Hypersensitivitätsantworten vom verzögerten Typ auf einen intradermalen Haut-Challenge-Versuch mit dem Antigen allein.

[0108] In einem viralen Neutralisierungstest werden Reihenverdünnungen von Seren zu Wirtszellen hinzugefügt, die dann nach dem Challenge mit einem infektiösen Virus Infektion hin beobachtet werden. Als Alternative können Reihenverdünnungen von Seren mit infektiösen Titern von Virus vor der Animpfung eines Tieres inkubiert werden und die angeimpften Tiere werden dann auf Zeichen von Infektion beobachtet.

[0109] Das transkutane Immunisierungssystem der Erfindung kann unter Verwendung von Challenge-Modellen in entweder Tieren oder Menschen beurteilt werden, welche die Fähigkeit der Immunisierung mit dem Antigen beurteilen, das Subjekt vor der Erkrankung zu schützen. Ein solcher Schutz würde eine antigenspezifische Immunantwort zeigen. Anstatt eines Challenge wird zum Beispiel generell angenommen, dass das Erreichen eines Anti-Diphtherie-Antikörpertiters von 5 IU/ml oder darüber einen optimalen Schutz anzeigt und als Ersatzmarker für Schutz dient (Plotkin und Mortimer, 1994).

[0110] Vakzinierung ist auch als Behandlung für Krebs und Autoimmunerkrankungen verwendet worden. Zum Beispiel kann die Vakzinierung mit einem Tumorantigen (z. B. prostataspezifisches Antigen) eine Immunantwort in der Form von Antikörpern, CTLs und Lymphozytenproliferation induzieren, die es dem Immunsystem des

Körpers erlaubt, Tumorzellen zu erkennen und abzutöten. Tumorantigene, die für die Vakzinierung verwendbar sind, sind beschrieben worden für Melanom (US-Patente Nr. 5,102,663, 5,141,742 und 5,262,177), Prostatakarzinom (US-Patent Nr. 5,588,866) und Lymphom (US-Patente Nr. 4,816,249, 5,068,177 und 5,277,159). Vakzinierung mit T-Zellrezeptor-Oligopeptid kann eine Immunantwort induzieren, die das Fortschreiten einer Autoimmunerkrankung aufhält (US-Patente Nr. 5,612,035 und 5,614,192; Antel et al., 1996; Vandenbark et al., 1996). Das US-Patent Nr. 5,552,30) beschreibt ebenfalls Antigene, die für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen geeignet sind.

[0111] Das Folgende soll die vorliegende Erfindung beispielhaft darstellen, wobei Beispiele 7 und 9 nicht unter den Schutzanspruch der Ansprüche fallen, die Ausübung der Erfindung ist jedoch in keiner Weise begrenzt oder eingeschränkt durch die Beispiele.

BEISPIELE Immunisierungsverfahren

[0112] Vierundzwanzig Stunden vor der Immunisierung wird der Rücken der Maus von der distalen Seite des Schulterblatts bis 0,5 cm oberhalb des Schwanzansatzes rasiert. Im Fall von C57BL/6 Mäusen werden die Tiere vor dem Rasieren leicht anästhesiert (40 mg/kg Ketamin: 4 mg/kg Xylazinmischung in Salzlösung). Am Tag der Immunisierung werden die Tiere mit 0,04 ml einer Anästhesiemischung (2,3 ml sterile Salzlösung (Sigma): 5 ml Ketamin (100 mg/ml, Parke-Davis): 0,5 ml Xylazin (100 mg/ml, Phoenix Pharmaceuticals)) immunisiert, was einer Enddosis von ca. 110 mg/kg Ketamin und 11 mg/kg Xylazin ergibt. Für Verfahren, die Alkoholtupfen erfordern, wird der Rücken zehnmal (5 × den Rücken Hochwischen in Richtung des Kopfes, Umdrehen des Alkoholtupfers und weitere 5 × Zurückwischen) unter Verwendung eines Isopropyltupfers abgewischt. Den Alkohol lässt man für 5 Minuten evaporieren. Hydratation des Rückens wird erreicht durch sanftes Reiben des Rückens mit einem sterilen, wassergesättigten Gazetupfer, so dass sich ein Wasservorrat auf dem Rücken bildet. Nach 5-minütiger Hydratisierungsdauer wird der Rücken mit einem trockenen Gazetupfer trocken getupft. Als nächstes wird das Antigen – im Allgemeinen ≤ 100 µg Antigen und Adjuvant in 100 µl Endvolumen – auf den Rücken aufgetragen unter Verwendung einer Pipette und Spitze, und für 60 bis 120 Minuten auf der Haut belassen. Nachdem die definierte Immunisierungsdauer erreicht worden ist, wird jede überschüssige Lösung im immunisierten Bereich mit Baumwollgaze abgetupft. Die Tiere werden dann unter einem langsamem, ständigen Strom von lauwarmem Leitungswasser für zehn Sekunden abgespült, um jedes überschüssige Antigen zu entfernen, trocken getupft und das Abspülverfahren wird wiederholt. Die Käfige werden dann auf Heizmaten platziert, bis sie (die Tiere) sich vollständig von der Anästhesie erholt haben.

Messung von menschlichen Anti-LT-Antikörpertitern

[0113] Anti-LT-IgG-Titer wurden wie zuvor beschrieben bestimmt (Svennerholm, A-M., Holmgren, J., Black, R., Levine, M. und Merson, M. Serologic differentiation between antitoxin responses to infection with *Vibrio cholerae* and enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis* 147, 541–522 (1983)). 96-Lochplatten (Typ Russell) wurden über Nacht mit Monosialogangliosid-G_{M1} (Sigma, St. Louis MO) von LT (Sigma), blockiert mit 5% Trockenmilch in PBS-0,05% Tween beschichtet. Antworten wurden nachgewiesen unter Verwendung von Ziege-Anti-Mensch-IgG(γ)-HRP (Kirkegaard und Perry, Gaithersburg, MD) und 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-sulfonat (Kirkegaard und Perry) als Substrat, und die Platten wurden bei 405 nm ausgelesen. Die Ergebnisse werden als ELISA-Einheiten (EE) wiedergegeben, die definiert sind als die inverse Verdünnung der Probe, die eine OD von 1,0 ergibt. Anti-LT-IgA wurde in der gleichen Weise bestimmt wie Anti-LT-IgG, mit der Ausnahme, dass Ziegen-Anti-Mensch-IgA(α)-HRP (Kirkegaard und Perry) als zweiter Antikörper verwendet wurde, und ODs wurden gegen eine Standard-IgA-Kurve aufgetragen, was Ergebnisse ausgedrückt in ng/ml ergab. Die IgA-Standardkurve und Gesamtserum IgA wurden unter Verwendung von nicht markiertem Ziegen-Anti-Mensch-IgA (Kirkegaard und Perry), gefolgt durch Blockieren wie oben und dann Auftragen von Reihenverdünnungen von IgA-Standard, bestimmt.

Beispiel 1.

[0114] Es wird angenommen, dass Abtupfen der Haut mit einem behandelten oder unbehandelten Tupfer physikalisch und chemisch einen kleinen Teil des Stratum Corneum entfernt und daher die Hautpenetration fördert. Tupfer können aus Materialien wie zum Beispiel Baumwolle, Nylon, Viskose und Polyethylen hergestellt werden. Es wird angenommen, dass Tupfen mit Alkohol einen kleinen Teil des Stratum Corneum entfernt und sowohl als physikalisches als auch als chemisches Mittel zur Penetrationsförderung wirkt. Im obigen Beispiel kann die Förderung der Immunantwort auf transkutane Immunisierung mit dieser Penetrationsförderungsmethode gesehen werden. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden anästhesiert und wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben rasiert. 24 Stunden später wurden die Rücken der Tiere abgewischt, entweder mit einem Gazetupfer, der mit Wasser gesättigt war „Wasser“, oder für ca. 10 Sekunden mit einem Alkohol-Präptup-

fer abgewischt, der 70% Isopropylalkohol „Isopropanol“ enthielt. Man ließ den Alkohol für ca. 5 Minuten evaporiieren. Das überschüssige Wasser wurde von den Rücken der „Wasser“-Gruppe durch Tupfen entfernt. Alle Tiere wurden dann mit 20 µg CT (100 µl einer 0,2 mg/ml-Lösung) behandelt. Die Entfernung von überschüssigem Antigen wurde wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben, durchgeführt.

[0115] Die Anti-CT-Antikörpertiter wurden unter Verwendung von ELISA, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (N + L)“, drei Wochen nach einer einzelnen Immunisierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Während CT deutlich immunogen in beiden Gruppen war, zeigte die Gruppe, die mit dem Alkohol-Präptupfer behandelt worden war, einen Titer, dessen geometrisches Mittel 6-fach höher war, und die individuellen Titer waren einheitlicher als bei den „Wasser“-Tieren. Es hat also den Anschein, dass chemische und physikalische Störung der Hautoberfläche mit Alkoholtupfern den Transfer von Antigen über den transkutanen Weg verstärkt.

Tabelle 1. Förderung der transkutanen Immunisierung durch chemische Penetrationsförderung: Anti-CT-Titer in Mäusen, deren Haut vor dem Auftragen des Antigens mit einem Alkohol-Präptupfer behandelt worden war.

Anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten			
Tier Nr.	Behandlung	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 3
7146	Wasser		1275
7147	Wasser		69
7148	Wasser		7420
7149	Wasser		6025
7150	Wasser		388
geometrisches Mittel			1088
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			7
7161	Isopropanol		3100
7162	Isopropanol		14797
7163	Isopropanol		6670
7164	Isopropanol		7426
7165	Isopropanol		7024
geometrisches Mittel			6928
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			7

Beispiel 2.

[0116] Um abzuschätzen, ob chemische Penetrationsförderung allein die transkutane Immunisierung steigern kann, wurde ein Detergens auf der Haut verwendet. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden anästhetisiert und rasiert, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Rücken der „Wasser“-Gruppe mit einem Gazetupfer, der mit Wasser gesättigt war, abgewischt und ein Wasservorrat auf dem Rücken platziert. Ca. 5 Minuten später wurde jegliches überschüssiges Wasser entfernt und 25 µg CT (50 µl einer 0,5 mg/ml-Lösung) wurden auf dem Rücken aufgetragen. Als Alternative wurden die Rücken der „5%-SDS“-Gruppe 24 Stunden nach dem Rasieren durch Betropfen von 300 µl 5%-SDS (Natriumdecylsulfat – eine 1 : 1-Mischung von deionisiertem Wasser und kommerzieller Vorratslösung von 10%-SDS), einem Detergens, für ca. 12 Minuten behandelt, gefolgt durch Abtupfen von jeglichem überschüssigem SDS mit einem trockenen Gazetupfer. SDS kann in einem Träger, wie zum Beispiel einem Tupfer, auf die Haut aufgebracht werden, dann kann das überschüssige SDS mit einem trockenen Gazetupfer entfernt werden. Danach wurden die Tiere hydratisiert und wie die „Wasser“-Gruppe immunisiert. Das Entfernen von überschüssigem Antigen erfolgte wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben.

[0117] Die Anti-CT-Antikörpertiter wurden unter Verwendung von ELISA, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H + L)“, zwei Wochen nach einer einzelnen Immunisierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2a und 2b gezeigt. Während CT deutlich immunogen in beiden Gruppen war, ist das geometrische Mittel des Titers in der mit 5% SDS behandelten Gruppe zweifach höher und die Titer waren einheitlicher bei den letztgenannten Tieren im Vergleich zu den „Wasser“-Tieren. Man kann also annehmen, dass die chemische Störung der Hautoberfläche mit Detergens (5% SDS) den Transfer von Antigen über den transkutanen Weg verstärkt.

Tabelle 2a. Förderung der transkutanen Immunisierung durch chemische Penetrationsförderung: Anti-CT-Titer in Mäusen, deren Haut vor dem Auftragen des Antigens mit Detergens (5% SDS) behandelt worden war.

Anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten			
Tier Nr.	Behandlung	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 2
546	Wasser		4629
547	Wasser		3154
548	Wasser		7288
549	Wasser		1719
550	Wasser		11779
geometrisches Mittel			3678
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			5
596	5 % SDS		6945
597	5 % SDS		2244
598	5 % SDS		8604
599	5 % SDS		7093
600	5 % SDS		12583
geometrisches Mittel			5553
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			1

Tabelle 2b. Förderung der transkutanen Immunisierung durch chemische Penetrationsförderung: Anti-CT-Titer in Mäusen, deren Haut vor dem Auftragen des Antigens mit Detergens (5% SDS) behandelt worden war.

Tier Nr.	Behandlung	Anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten	
		Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 3
546	Wasser		22525
547	Wasser		8939
548	Wasser		11885
549	Wasser		5121
550	Wasser		37770
geometrisches Mittel			10521
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			11
596	5 % SDS		102387
597	5 % SDS		6597
598	5 % SDS		47245
599	5 % SDS		45565
600	5 % SDS		38413
geometrisches Mittel			34725
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			6

Beispiel 3.

[0118] Eine andere Form von chemischer Penetrationsförderung, ein Enthaarungsmittel (wie zum Beispiel Kalziumhydroxid oder Ähnliches) wird in dermatologischen Experimenten häufig verwendet, und es wurde gezeigt, dass es die transkutane Immunisierung verstärkt. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden anästhesiert und, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben, rasiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Rücken der „Wasser“-Gruppe mit einem Gazetupfer, der mit Wasser gesättigt war, abgewischt, und ein Wasservorrat wurde auf dem Rücken platziert. Ca. 5 Minuten später wurde jegliches überschüssige Wasser entfernt, und 25 µg CT (50 µl einer 0,5 mg/ml-Lösung) wurden auf dem Rücken aufgetragen. Als Alternative wurden die Rücken der „Nair®“-Gruppe vierundzwanzig Stunden nach dem Rasieren mit 100 ml einer Nair®-Creme für ca. 12 Minuten behandelt, gefolgt von Abwischen der Formulierung mit einem Gazetupfer, der mit Wasser gesättigt war. Eine solche Behandlung kann für ca. 0,1 bis 30 Minuten fortgeführt werden, vorzugsweise für ca. 20 Minuten und weiter bevorzugt für ca. 12 Minuten. Danach wurden die Tiere hydratisiert und wie in der „Wasser“-Gruppe immunisiert. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben.

[0119] Die Anti-CT-Antikörpertiter wurden unter Verwendung von ELISA, wie oben beschrieben, für „ELISA-IgG (H + L)“ zwei Wochen nach einer einzelnen Immunisierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3a und 3b gezeigt. Während CT deutlich immunogen in beiden Gruppen war, war das geometrische Mittel des Titers in der „Nair®“-Gruppe dreifach höher, und die Titer waren einheitlicher innerhalb der letztgenannten Tiere im Vergleich zu den „Wasser“-Tieren. Es hat also den Anschein, dass chemische Störung der Hautoberfläche mit Kalziumhydroxid, dem aktiven Inhaltsstoff in Nair®-Creme, den Transfer von Antigen über den transkutanen Weg verstärkt.

Tabelle 3a. Förderung der transkutanen Immunisierung durch chemische Penetrationsförderung: Anti-CT-Titer in Mäusen, deren Haut vor dem Auftragen des Antigens mit Kalziumhydroxid (Nair®) behandelt wurde.

Tier Nr.	Behandlung	Anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten	
		Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 2
546	Wasser		4629
547	Wasser		3154
548	Wasser		7288
549	Wasser		1719
550	Wasser		11779
geometrisches Mittel			3678
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			5
581	Nair®		17621
582	Nair®		12261
583	Nair®		7235
584	Nair®		7545
585	Nair®		5997
geometrisches Mittel			10421
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			4

Tabelle 3b. Förderung der transkutanen Immunisierung durch chemische Penetrationsförderung: Anti-CT-Titer in Mäusen, deren Haut vor dem Auftragen des Antigens mit Kalziumhydroxid (Nair®) behandelt wurde.

Tier Nr.	Behandlung	Anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten	
		Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 3
546	Wasser		22525
547	Wasser		8939
548	Wasser		11885
549	Wasser		5121
550	Wasser		37770
geometrisches Mittel			10521
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			11
581	Nair®		34222
582	Nair®		45674
583	Nair®		50224
584	Nair®		27270
585	Nair®		21832
geometrisches Mittel			38251
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			15

Beispiel 4.

[0120] Weitere Studien wurden durchgeführt, um die Wirkung von chemischer Penetrationsförderung unter Verwendung von keratinolytischen Formulierungen (wie Salicylat) zu beurteilen. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden anästhesiert und, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben, rasiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Rücken der „Wasser“-Gruppe mit einem Gazetupfer, der mit Wasser gesättigt war, abgewischt, und ein Vorrat von Wasser wurde auf den Rücken platziert. Ca. 5 Minuten später wurde jegliches überschüssige Wasser entfernt, und 25 µg CT (50 µl einer 0,5 mg/ml-Lösung) wurden auf dem Rücken aufgetragen. Als Alternative wurden vierundzwanzig Stunden nach dem Rasieren die Rücken der „Salicylat/Wasser“-Gruppe mit einem Gazetupfer behandelt, der mit 10%-Salicylatsuspension gesättigt war (1 Tablette (325 mg) zugelassenes Markenaspizin gelöst in 3,25 ml deionisiertem Wasser). Eine solche Behandlung kann für ca. 0,1 bis 30 Minuten, vorzugsweise für ca. 20 Minuten und weiter bevorzugt für ca. 10 Minuten fortgeführt werden. Ca. 10 Minuten später wurde jede verbliebene Lösung abgetupft, die Rücken der Tiere wurden für 5 Minuten mit Wasser hydratisiert, gefolgt von Entfernen des überschüssigen Wassers und dann topischer Applikation von 25 µg CT. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben.

[0121] Die Anti-CT-Antikörpertiter wurden unter Verwendung von ELISA wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (N + L)“ zwei Wochen nach einer einzelnen Immunisierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt. Während CT deutlich immunogen in beiden Gruppen war, war das geometrische Mittel des Titers in der salicylatbehandelten Gruppe 4-fach höher, und die Titer waren einheitlicher bei den letztgenannten Tieren im Vergleich zu den „Wasser“-Tieren. Es hat also den Anschein, dass die chemische Störung der Hautoberfläche mit Salicylat den Transfer von Antigen über den transkutanen Weg verstärkt.

Tabelle 4. Förderung der transkutanen Immunisierung durch chemische Penetrationsförderung: Anti-CT-Titer in Mäusen, deren Haut vor dem Auftragen des Antigens mit Salicylat (Aspirin) behandelt worden war.

Tier Nr.	Behandlung	Anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten	
		Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 2
741	Wasser		272
742	Wasser		nicht vorhanden
743	Wasser		456
744	Wasser		443
745	Wasser		1395
geometrisches Mittel			526
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			7
756	Salicylat/Wasser		2279
757	Salicylat/Wasser		4581
758	Salicylat/Wasser		4658
759	Salicylat/Wasser		2771
760	Salicylat/Wasser		593
geometrisches Mittel			2402
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			36

Beispiel 5.

[0122] Um die Rolle von physikalischer/mechanischer Penetrationsförderung einzuschätzen, wurde ein Schleifmittel in Form einer gewöhnlichen Nagelfeile verwendet, um einen Teil des Stratum Corneum zu entfernen. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden anästhesiert und, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben, rasiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Rücken der Tiere entweder mit einem Gazetupfer, der mit Wasser „Wasser“ gesättigt war, abgewischt oder 10 mal mit einer mittelkörnigen Nagelfeile „Nagelfeile“ gebürstet und dann mit einem Gazetupfer abgewischt, der mit Wasser gesättigt war. Ca. 5 Minuten nach der Wasserbehandlung wurde jegliches überschüssige Wasser entfernt und 20 µg CT (100 µl einer 0,2 mg/ml-Lösung) auf den Rücken aufgetragen. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben.

[0123] Die Anti-CT-Antikörpertiter wurden unter Verwendung von ELISA, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H + L)“, drei Wochen nach einer einzelnen Immunisierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 gezeigt. Während CT deutlich immunogen in beiden Gruppen war, war das geometrische Mittel des Titers in der mit der Nagelfeile behandelten Gruppe 10-fach höher, und die Titer waren einheitlicher bei den letztgenannten Tieren im Vergleich zu den „Wasser“-Tieren. Es hat daher den Anschein, dass die physikalische Störung der äußeren Hautoberfläche mit einer Nagelfeile den Transfer von Antigen über den transkutanen Weg verstärkt. Dies kann von Techniken unterschieden werden, die darauf abzielen, die Haut zu durchstechen und das Antigen durch die Haut zu transferieren wie bei subkutaner, intradermaler oder intramuskulärer Injektion.

[0124] Diese einfache Vorrichtung könnte durch andere physikalische Störungsvorrichtungen ersetzt werden, um Antigene und Adjuvanzien in die Epidermis zu bringen wie Mikronadeln, die eine Länge aufweisen, welche nur das Stratum Corneum oder die oberflächliche Epidermis angreift, Vorrichtungen, die für TB-Zacken-Tests verwendet werden, mit Gas betriebene Kanonen, welche die Dermis nicht durchdringen, Klebeband für die Abrissmethode oder andere für die Zerstörung der oberen Hautoberfläche geeigneten Vorrichtungen, von denen be-

kannt ist, dass sie nur das Stratum Corneum oder die oberflächliche Epidermis stören.

Tabelle 5. Förderung der transkutanen Immunisierung durch physikalische Penetrationsförderung: Anti-CT-Titer in Mäusen, deren Haut vor dem Auftragen des Antigens mit einer Nagelfeile behandelt worden war.

Tier Nr.	Behandlung	Anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten	
		Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 3
7146	Wasser		1275
7147	Wasser		69
7148	Wasser		7420
7149	Wasser		6025
7150	Wasser		388
geometrisches Mittel			1088
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			7
7151	Nagelfeile		6632
7152	Nagelfeile		9380
7153	Nagelfeile		31482
7154	Nagelfeile		11142
7155	Nagelfeile		11761
geometrisches Mittel			12074
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			9

Beispiel 6.

[0125] Ein weiteres Mittel für die physikalische/mechanische Penetrationsförderung wurde angewandt mittels eines Schleifmittels, um einen Teil des Stratum Corneum zu entfernen und Zugang zu der darunter liegenden Epidermis zu ermöglichen. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden anästhesiert und, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben, rasiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Rücken der Tiere entweder mit einem Gazetupfer, der mit Wasser, „Wasser“, gesättigt war, oder mit einem Gazetupfer, der mit Wasser gesättigt war, abgewischt, gefolgt von Reiben für 10 Sekunden mit einem Nylonschwamm (buf-puf®), „buf-puf“, um die äußersten Schichten des Stratum Corneum zu entfernen. Überschüssiges Wasser wurde von den Rücken der „Wasser“-Gruppe entfernt, und dann wurden 20 µg CT (100 µl einer 0,2 mg/ml-Lösung) auf die Rücken aller Tiere aufgetragen. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben.

[0126] Die Anti-CT-Antikörpertiter wurden unter Verwendung von ELISA, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H + L)“, drei Wochen nach einer einzelnen Immunisierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 gezeigt. Während CT deutlich immunogen in beiden Gruppen war, war das geometrische Mittel des Titers in der buf-puf®-behandelten Gruppe 2-fach höher, und die Titer bei den einzelnen Tieren waren einheitlicher bei den letztgenannten Tieren verglichen mit den „Wasser“-Tieren. Es hat also den Anschein, dass die physikalische Störung der Hautoberfläche mit einem buf-puf® den Transfer von Antigen über den transkutanen Weg verstärkt.

[0127] Diese einfache Vorrichtung könnte durch andere physikalische Penetrationsvorrichtungen ersetzt werden, um Antigene und Adjuvanzien in die Epidermis zu bringen, wie eine Nadel und Tuberkulinspritze, die für intradermale Injektion verwendet wird, Mikronadeln, die eine Länge aufweisen, die nur das Stratum Corneum

oder die oberflächliche Dermis durchdringt, Vorrichtungen, die für TB-Zacken-Tests verwendet werden, aufscheuernde Auflagen, die lösliche Kristalle aufweisen, wie Sukrose oder Natriumchlorid, oder biologisch abbaubare Polymere, die in die Auflage imprägniert wurden, und über die Haut gerieben werden, bevor die Auflage befestigt wird, wobei das Antigen entweder in den Kristallen oder in der Matrix enthalten ist, mit Gas betriebene Kanonen, Klebeband für die Abrissmethode oder andere Vorrichtungen, von denen bekannt ist, dass sie nur in die Epidermis oder die oberflächliche Dermis eindringen.

Tabelle 6. Förderung der transkutanen Immunisierung durch physikalische Penetrationsförderung: Anti-CT-Titer in Mäusen, deren Haut vor dem Auftragen des Antigens mit einem Schleifmittel (wie zum Beispiel buf-puf®) behandelt worden war.

Tier Nr.	Behandlung	Anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten	
		Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 3
7146	Wasser		1275
7147	Wasser		69
7148	Wasser		7420
7149	Wasser		6025
7150	Wasser		388
geometrisches Mittel			1088
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			7
7166	buf-puf®		5376
7167	buf-puf®		2319
7168	buf-puf®		1209
7169	buf-puf®		2871
7170	buf-puf®		2785
geometrisches Mittel			2607
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			8

Beispiel 9.

[0128] Die transkutane Immunisierung mit bakteriellen ADP-ribosylierenden Exotoxinen wie CT und LT, scheint dem Immunsystem signifikante „Gefahr“-Signale zu liefern, die eine wirksame Immunantwort stimulieren. Solche Verbindungen wirken als Adjuvanzien. Es war eine Überraschung festzustellen, dass einfache Mischungen von solchen Adjuvanzien in einer Weise auf der Haut platziert, welche die Haut hydratisiert, zu wirksamen Immunantworten führen. Dies wurde in einer früheren Patentanmeldung (PCT/US97/21324 – WO 98/20734) beschrieben. Vorausgesetzt, dass ein Adjuvant wie CT (86 KD) als ein Adjuvant auf der Haut wirken kann, würde man jedoch erwarten, dass andere Adjuvanzien, insbesondere jene, die auf bakteriellen Produkten oder Motiven basieren, stimulatorisch wären, wenn sie in einer Weise auf der Haut platziert würden, welche die Haut hydratisiert und/oder mit der Verwendung von Penetrationsförderern.

[0129] Wir verwendeten bakterielle DNA, um zu bestätigen, dass diese Erwartung richtig ist. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden, wie oben im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben, rasiert und anästhesiert. Am Tag der Immunisierung wurden die Rücken der Mäuse mit Isopropanol abgewischt, um die Penetration zu fördern. Nachdem der Alkohol evaporiert war (ungefähr 5 Minuten), wurden 100 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), enthaltend 100 µg DNA (CpG1 oder CpG2) und 100 µg Diphtherietoxoid (DT) für 90 bis 120 Mi-

nuten auf dem Rücken aufgetragen. Es wurden Oligonukleotide durch Oligos Etc mit einem Phosphothioat-Rückgrat zur Verbesserung der Stabilität synthetisiert. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Die Immunisierung wurde 4 und 8 Wochen später wiederholt. 10 Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen und die Anti-DT-Titer wurden unter Verwendung eines ELISA, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (N + L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7a gezeigt.

[0130] Die gemeinsame Verabreichung von DT und einer Kontroll-DNA-Sequenz (CpG2: TCCAATGAGCTT-CCTGAGTCT) induzierte keinen nachweisbaren Anstieg in den Anti-DT-Titern. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe einer DNA-Sequenz, die ein nicht-methyliertes CpG-Dinukleotid, flankiert durch zwei 5'-Purine und zwei 3'-Pyrimidine (CpG1 (immunstimulatorische DNA): TCCATGACGTTCCCTGACGTT), zu einem nachweisbaren Anstieg im Serum-Anti-DT-IgG-Titer in 5 von 5 Tieren. Es hat daher den Anschein, dass bakterielle DNA die entsprechenden Motive wie CpGs (6 KD) enthält, als Adjuvanz verwendet werden kann, um den Transfer von Antigenen durch die Haut zur Induktion von antigenspezifischen Antikörperantworten zu verstärken.

Tabelle 7a. Adjuvanzaktivität von bakterieller DNA, aufgetragen auf die Haut unter Verwendung von Penetrationsförderung: humorale Immunantwort.

Tier Nr.	Anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Adjuvanz/Antigen	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 10
7261	CpG1/DT		1171
7262	CpG1/DT		22750
7263	CpG1/DT		4124
7264	CpG1/DT		126
7265	CpG1/DT		115
geometrisches Mittel			1096
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		6	
7266	CpG2/DT		19
7267	CpG2/DT		12
7268	CpG2/DT		5
7269	CpG2/DT		5
7270	CpG2/DT		11
geometrisches Mittel			9
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		5	

[0131] Die transkutane Wirkung von transkutaner Immunisierung kann auch durch T-Zell- Proliferation nachgewiesen werden. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden, wie oben im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben, rasiert und anästhesiert. Am Tag der Immunisierung wurden die Rücken der Mäuse mit Isopropanol abgewischt. Nachdem der Alkohol evaporiert war (ungefähr 5 Minuten), wurden 100 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), enthaltend 100 µg DNA (CpG1 oder CpG2) und 100 µg Diphtherietoxoid (DT), für 90 bis 120 Minuten auf dem Rücken aufgetragen. Es wurden Oligonukleotide durch Oligos Etc mit einem Phosphothioat-Rückgrat zur Verbesserung der Stabilität synthetisiert. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Die Immunisierung wurde 4 und 8 Wochen später wiederholt. 12 Wochen nach der ersten Immunisierung wurden drainierende (inguinale) LK entfernt und von

5 immunisierten Tieren vereinigt. Die Proliferationskapazität als Antwort auf Medium oder Antigen (DT) wurde in einem Standard 4-Tage-Proliferationstest unter Verwendung von 3-H-Einbau als ein ablesbares Ergebnis festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7b gezeigt. Die gemeinsame Verabreichung von DT und einer DNA-Sequenz, die ein nicht-methyliertes CpG-Dinukleotid, flankiert durch zwei 5'-Purine und zwei 3'-Pyrimidine (CpG1 (immunstimulatorische DNA): TCCATGACGTTCTGACGTT) enthielt, führte zu einem nachweisbaren Anstieg in der antigenspezifischen proliferativen Antwort. Es hat daher den Anschein, dass bakterielle DNA, die entsprechende Motive enthält, als Adjuvanz verwendet werden kann, um den Transfer von Antigen durch die Haut zur Induktion von proliferativen Antworten zu verstärken.

Tabelle 7b. Adjuvanzeffekt von bakterieller DNA, aufgetragen auf die Haut: LK-Zell-Proliferation

Proliferation (cpm) 3-H-Einbau <i>in vitro</i> in Antigene		
<i>in vivo</i> angewandte Antigene	Medium	DT
Normale LK	339	544
CpG1/DT	1865	5741

Beispiel 8.

[0132] Die transkutane Immunisierung mit bakteriellen ADP-ribosylierenden Exotoxinen, wie CT und LT, scheint dem Immunsystem signifikante „Gefahr“-Signale zu liefern, die eine wirksame Immunantwort stimulieren. Solche Verbindungen wirken als Adjuvantien. Es war eine Überraschung festzustellen, dass einfache Mischungen von solchen Adjuvantien in einer Weise auf der Haut platziert, welche die Haut hydratisiert, zu wirksamen Immunantworten führen. Dies wurde in einer früheren Patentanmeldung (PCT/US97/21324 – WO 98/20734) beschrieben. Vorausgesetzt, dass ein Adjuvanz wie CT als ein Adjuvanz auf der Haut wirken kann, würde man jedoch erwarten, dass andere Adjuvantien, insbesondere jene, die auf bakteriellen Produkten oder Motiven basieren, stimulatorisch wären, wenn sie in einer Weise auf der Haut platziert würden, welche die Haut hydratisiert und/oder mit der Verwendung von Penetrationsförderern. Es wurden genetisch veränderte Toxine verwendet, um diese Erwartung zu bestätigen. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden rasiert, anästhesiert und immunisiert, wie oben im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Die Tiere erhielten 3 bis 5 Wochen nach der ersten Immunisierung eine Auffrischungsimpfung und zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde Serum gesammelt. Die verwendeten Adjuvantien waren die genetisch veränderten Toxine: LTK63, ein enzymatisch inaktives LT-Derivat und LTR72, ein LT-Derivat, das 0,6% der enzymatischen Aktivität behalten hat. 100 µg Diphtherietoxoid (DT) wurde als Antigen verwendet.

[0133] Die Anti-DT-Antikörpertiter wurden unter Verwendung von ELISA, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (N + L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 gezeigt. Anti-DT-Titer waren deutlich erhöht im Serum von Tieren, die entweder mit LTK63 oder LTR72 und DT immunisiert worden waren, verglichen mit Tieren im Serum, das vor der Immunisierung gesammelt wurde (Kontrollblut vor Immunisierung). Es hat daher den Anschein, dass genetisch detoxifizierte Mutanten des hitzelabilen Enterotoxins (LT) als Adjuvantien auf der Haut verwendet werden können.

Tabelle 8. Verwendung von genetisch veränderten Toxinen, LTK63 und LTR72 als Adjuvanz auf der Haut.

Tier Nr.	Anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Adjuvanz/Antigen	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 10
653	LTK63/DT		20228
654	LTK63/DT		nicht vorhanden
655	LTK63/DT		342
656	LTK63/DT		2445
657	LTK63/DT		< 100
geometrisches Mittel			1140
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		< 100	
663	LTR72/DT		12185
664	LTR72/DT		10917
665	LTR72/DT		151
666	LTR72/DT		2057
667	LTR72/DT		50923
geometrisches Mittel			4620
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		< 100	

Beispiel 9.

[0134] Eine andere Klasse von Verbindungen, Cytokine, von denen bekannt ist, dass sie als Adjuvantien wirken, veranschaulicht das Prinzip, dass man von Adjuvantien im Allgemeinen erwarten kann, dass sie ähnlicher Weise wie Choleratoxin wirken. Von TNF α ist auch bekannt, dass es eine Verbindung ist, die Langerhanszellen aktiviert.

[0135] 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden rasiert und anästhesiert, wie für das „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Am Tag der Immunisierung wurden die Rücken der Mäuse mit Isopropanol abgewischt. Nachdem der Alkohol evaporiert war (ungefähr 5 Minuten) wurden 100 μ l phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), enthaltend 0,83 μ g TNF-alpha (rekombinantes Maus-TNF-alpha, Endogen), IL-2 (1 μ g rekombinantes Maus-IL-2 (Sigma)) oder Mock Adjuvanz (CpG2) auf die Haut auf dem Rücken aufgetragen, zusammen mit 100 μ g Diphtherietoxoid (DT) für 90 bis 120 Minuten. Es wurden Oligonukleotide von Oligo Etc mit einem Phosphothioat-Rückgrat zur Verbesserung der Stabilität synthetisiert. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Die Immunisierung wurde 4 und 8 Wochen später wiederholt. 10 Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen und die Anti-DT-Titer unter Verwendung eines ELISA, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H + L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 gezeigt.

[0136] Die gemeinsame Verabreichung von DT und einem Mock Adjuvanz (CpG2) induzierte keinen nachweisbaren Anstieg in den Anti-DT-Titern. Im Gegensatz dazu ergab die topische Anwendung von TNF-alpha (0,8 μ g) einen nachweisbaren Anstieg im Serum-Anti-DT-IgG-Titer bei 3 von 5 Tieren im Vergleich zu entweder Anti-DT-Titern der mit Mock Adjuvanz behandelten Mäuse, oder Seren, die vor der Immunisierung gesammelt wurden (Kontrollblut vor Immunisierung). In ähnlicher Weise ergab die topische Anwendung von IL-2 (1 μ g) einen messbaren Anstieg im Serum-Anti-DT-IgG-Titer bei 4 von 5 Tieren im Vergleich mit entweder Anti-DT-Titern von mit ScheinAdjuvanz behandelten Mäusen oder Seren, die vor der Immunisierung gesammelt wurden

(Kontrollblut vor der Immunisierung). Es hat daher den Anschein, dass die Cytokine wie IL-2 und TNF-alpha als Adjuvanzien auf der Haut verwendet werden können und dass Verbindungen, die Langerhanszellen aktivieren, für die transkutane Immunisierung verwendet werden können.

Tabelle 9. Adjuvanzaktivität des Cytokins TNF-alpha aufgetragen auf die Haut.

Tier Nr.	Anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Adjuvanz/Antigen	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 10
7326	TNF-alpha/DT		1808
7327	TNF-alpha/DT		830
7328	TNF-alpha/DT		7
7329	TNF-alpha/DT		1477
7330	TNF-alpha/DT		7
geometrisches Mittel			159
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		1	
7331	IL-2/DT		13
7332	IL-2/DT		111
7333	IL-2/DT		345
7334	IL-2/DT		49
7335	IL-2/DT		35
geometrisches Mittel			61
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		2	
7266	CpG2/DT		19
7267	CpG2/DT		12
7268	CpG2/DT		5
7269	CpG2/DT		5
7270	CpG2/DT		11
geometrisches Mittel			9
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		5	

Beispiel 10.

[0137] Die B-Untereinheit von Choleratoxin ist eine andere Klasse von Adjuvanzien, der die A-Untereinheit und damit die ADP-Ribosyltransferaseaktivität von CT fehlt. Als solche stellt CTB ein Adjuvanz dar, das einzigartig ist und nützlich sein kann, weil es nicht toxisch ist, wenn es in den Verdauungsapparat aufgenommen wird.

[0138] 6 bis 8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden anästhesiert und rasiert, wie im "Immunisierungsverfahren" beschrieben. Am Tag der Immunisierung wurden die Rücken der Mäuse mit Isopropanol abgewischt. Nachdem der Alkohol evaporiert war (ungefähr 5 Minuten), wurden 100 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), enthaltend 100 µg aufgereinigte Choleratoxin B-Untereinheit (CTB) und/oder 100 µg Diphtherietoxoid (DT) für 90 bis 120 Minuten auf dem Rücken aufgetragen. Das Entfernen des überschüssigen Antigens wurde durchgeführt wie beschrieben im "Immunisierungsverfahren". Die Immunisierung wurde 4 und 8 Wochen später wiederholt. Zehn Wochen nach der ersten Immunisierung wurden den Tieren Blutproben entnommen und die Anti-DT-Titer unter Verwendung eines ELISAs, wie oben beschrieben für "ELISA-IgG (H + L)", bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 gezeigt.

[0139] Die Anti-DT-Titer waren deutlich erhöht im Serum von Tieren, die mit CTB und DT immunisiert worden waren im Vergleich zu den Titern im Serum von Tieren, die mit DT allein behandelt wurden, oder jenen im Serum der Kontrollblutprobe vor der Immunisierung, wie in Tabelle 10 gezeigt. Es hat daher den Anschein, dass aufgereinigtes CTB als Adjuvant auf der Haut verwendet werden kann.

Tabelle 10. Verwendung von aufgereinigter Choleratoxin B-Untereinheit von *V. cholerae* als ein Adjuvant auf der Haut.

Anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten			
Tier Nr.	Adjuvant / Antigen	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 10
51	DT		11
52	DT		7
53	DT		4
54	DT		8
55	DT		7
geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			7
			4
81	CTB/DT		14880
82	CTB/DT		371
83	CTB/DT		14810
84	CTB/DT		108
85	CTB/DT		27
geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			751
			5

Beispiel 11.

[0140] Adjuvanten, die strukturell unterschiedlich sind, werden ihre Verstärkung wahrscheinlich durch unterschiedliche Wirkungen erzielen. Adjuvanten, die ihre Wirkung durch unterschiedliche Mechanismen induzieren, können entweder additive oder synergistische Wirkungen auf die Verstärkung der Immunantwort haben. Wir haben herausgefunden, dass die Verwendung von zwei Adjuvanten gleichzeitig die Antwort auf transkutane Immunisierung im Vergleich zu den individuellen Adjuvanten allein förderte.

[0141] 6 bis 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden rasiert und anästhesiert, wie für das "Immunisierungsverfahren" beschrieben. Am Tag der Immunisierung wurden die Rücken der Mäuse mit Isopropanol abgewischt. Nachdem der Alkohol evaporiert war (ungefähr 5 Minuten) wurde 100 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), enthaltend 100 µg der immunstimulatorischen DNA (CpG1) und/oder 100 µg Choleratoxin (CT), auf dem Rücken mit 100 µg eines löslichen leishmanialen Antigenextrakts (SLA) für 90 bis 120 Minuten aufgetragen. SLA ist ein Antigenextrakt, der am Walter Reed Army Institute of Research durch zentrifugale Isolation der löslichen

Proteine der promastigoten Form von *Leishmania major* in einem Ultraschalllysat für 90 bis 120 Minuten, hergestellt wurde. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt, wie im "Immunisierungsverfahren" beschrieben. Die Immunisierung wurde 4 und 8 Wochen später wiederholt. 12 Wochen nach der ersten Immunisierung wurden drainierende (inguinale) LK entfernt und von zwei immunisierten Tieren vereinigt. Die Proliferationskapazität als Antwort auf Medium oder Antigen (SLA) wurde in einem Standard 4-Tage-Proliferationstest unter Verwendung von 3-H-Einbau als ablesbares Ergebnis festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 gezeigt.

[0142] Die gemeinsame Verabreichung von SLA und CpG1 (immunstimulatorische DNA, die ein nicht-methyliertes CpG Dinukleotid, flankiert durch zwei 5'-Purine und zwei 3'-Pyrimidine, enthält TCCATGACGTTCCCT-GACGTT), oder CT führte zu einem nachweisbaren Anstieg in der antigenspezifischen, proliferativen Antwort. Die Antigen-(SLA)-spezifische, proliferative Antwort war jedoch ungefähr 20-mal höher in Lymphknotenzellkulturen von Tieren, die gleichzeitig sowohl CpG1, als auch CT ausgesetzt waren, im Vergleich zu Kulturen, die von Tieren abgeleitet waren, die dem jeweiligen Adjuvant allein ausgesetzt waren. Es hat daher den Anschein, dass bakterielle DNA, die entsprechende Motive enthält, mit ADP-ribosylierenden Exotoxinen wie CT als Adjuvant auf der Haut synergetisch wirken können, um höhere Immunantworten zu induzieren, als jedes Adjuvant allein.

Tabelle 11. Synergie zwischen immunstimulatorischer DNA und ADP-ribosylierenden Exotoxin (CT) als Adjuvanten, wenn sie auf die Haut aufgetragen werden.

<i>in vitro</i> Proliferation (cpm) 3-H-Einbau in Antigene		
<i>in vivo</i> aufgetragene Substanzen	Medium	SLA
normaler LK	180	219
SLA	200	159
SLA/CpG1	1030	2804
SLA/CT	232	2542
SLA/CpG1/CT	2232	47122

Beispiel 12.

[0143] Die transkutane Immunisierung induziert wirksame Immunantworten, wenn sie allein als Transferverfahren verwendet wird. Wir haben auch herausgefunden, dass transkutane Immunisierung nacheinander mit anderen Transferwegen verwendet werden kann, um eine Immunantwort zu stimulieren.

[0144] 6 bis 8 Wochen alte BALB/c Mäuse. Am Tag 0 erhielten beide Tiergruppen eine 50 µl intramuskuläre (im.) Injektion von DT (5 µg), gemischt mit Alaun (Rehydrogel – 25 µg in NaCl) in den hinteren Oberschenkel. Acht und 16 Wochen später wurden Mäuse in der im/tc/tc Gruppe rasiert, anästhesiert und über den transkutanen Weg immunisiert, wie beschrieben für das "Immunisierungsverfahren", unter Verwendung von 100 µg Choleratoxin als Adjuvant und 100 µg Diphtherietoxoid als Antigen. Die Immunisierungslösung wurde auf dem Rücken für 90 bis 120 Minuten aufgetragen. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt, wie im "Immunisierungsverfahren" beschrieben. Zweiundzwanzig Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen und die anti-DT-Titer unter Verwendung eines ELISA, wie oben beschrieben für "ELISA-IgG (H + L)", bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 gezeigt.

[0145] Eine einzelne im. Injektion von 5 µg DT induziert einen nachweisbaren Anstieg in den Serum-Anti-DT-Titern im Vergleich mit Titern in Seren, die dem gleichen Tier vor der Immunisierung (Kontrollblut vor Immunisierung) entnommen wurden. Das Auffrischen der Impfung der erstmals im. immunisierten Tiere unter Verwendung des transkutanen Immunisierungsverfahren ergab einen 60-fachen Anstieg im geometrischen Mittel des Titers, und alle transkutan auffrischungs-geimpften Tiere wiesen eindeutig höhere Anti-DT-Titer auf als jene, die in der erstmals im. immunisierten Gruppe beobachtet wurden. Daher kann die transkutane Immunisierung zur Auffrischung von antigenspezifischen Titern in Mäusen verwendet werden, in denen die primäre Immunisierung mit dem Antigen über den im. Weg erfolgte. Wir haben außerdem herausgefunden, dass erstmals im. immunisierte Tiere durch transkutane Immunisierung (TCI) auffrischungs-geimpft werden können. Ver-

schiedene Kombinationen von TCI Erstimmunisierung oder Auffrischungsimpfung über andere Wege und Schemata kann man sich vorstellen einschließlich oralen, bukkalen, nasalen, rektalen, vaginalen, intradermalen, über Kanonen oder anderen Mitteln des Transports. Zusätzlich können sich Antigene in Weg und Zusammensetzung unterscheiden, einschließlich Protein abwechselnd mit Glykoprotein, Untereinheit mit Holotoxin, DNA Erstimmunisieren gefolgt durch Protein, Nukleinsäure über im. gefolgt durch Nukleinsäure durch TCI. Die transkutane Immunisierung kann dazu verwendet werden, die Immunisierung von Kindern aufzufrischen, die im Kleinkindalter erstmals immunisiert wurden, oder von Erwachsenen, die in der Kindheit erstmals immunisiert wurden. Die Einfachheit des Transports kann die Effizienz von Vakzinien, wie die von Influenzavakzinien verstärken, dadurch dass mehrfache Auffrischungen durch Verwendung einer Auflage möglich werden.

Tabelle 12. Auffrischungsimpfen von erstmals im. immunisierten Tieren unter Verwendung des transkutanen Immunisierungsverfahrens.

Tier Nr.	Adjuvanz / Antigen	Verabreichungs- weg	Anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten	
			Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 22
8563	DT	im.		54227
8564	DT	im.		11833
8565	DT	im.		106970
8566	DT	im.		10830
8567	DT	im.		4003
geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung				19711
20				
8568	DT/CT+DT/CT+DT	im./tc/tc		628838
8569	DT/CT+DT/CT+DT	im./tc/tc		2035507
8570	DT/CT+DT/CT+DT	im./tc/tc		1164425
8571	DT/CT+DT/CT+DT	im./tc/tc		nicht erhältlich
8572	DT/CT+DT/CT+DT	im./tc/tc		1263138
geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung				1171368
10				
8558	DT/DT/DT	im./im./im.		nicht erhältlich
8559	DT/DT/DT	im./im./im.		542669
8560	DT/DT/DT	im./im./im.		770150
8561	DT/DT/DT	im./im./im.		545894
8562	DT/DT/DT	im./im./im.		671898
geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung				625721
15				

Beispiel 13.

[0146] Weil TCI das Immunsystem in einer solch wirksamen Weise zu stimulieren scheint, ist es möglich, dass ein Adjuvanz, das an einer Stelle auf der Haut platziert wurde, als ein Adjuvanz für ein Antigen wirkt, das an anderer Stelle platziert wurde. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden anästhesiert und rasiert, wie im "Immunisierungsverfahren" beschrieben. Die Tiere wurden nicht am Ohr markiert, sondern in Käfigen gehalten, die mit A, C oder G markiert waren. Am Tag der Immunisierung wurde die dorsale Oberfläche des Mausohrs durch sanftes Reiben der äußeren Hautoberfläche mit einem Auftragsmittel mit einer Wattespitze behandelt,

die 70% Isopropanol enthielt. Nach 5 Minuten wurde das überschüssige Wasser von wasserbehandelten Ohren abgetupft, und Adjuvanz (50 µg CT) und/oder Antigen (100 µg Rinderserumalbumin (BSA) wurde auf die Oberfläche des linken oder rechten Ohrs (beschrieben in der Tabelle) in 50 µl phosphatgepufferter Salzlösung aufgetragen. Nach zweieinhalb Stunden wurden die Ohren zweimal abgespült und trockengeputzt. Die Immunisierung der Mäuse wurden in ähnlicher Weise 4 und 8 Wochen später aufgefrischt. 12 Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen und die Anti-BSA-Titer unter Verwendung eines ELISAs, wie oben beschrieben für "ELISA-IgG (H + L)", bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 gezeigt.

[0147] Das Auftragen von BSA allein auf die Haut war nur schwach immunogen, wobei nur 1 von 5 Tieren einen ELISA-Titer entwickelte, der über 100 ELISA-Einheiten lag. Im Gegensatz dazu entwickelten 9 von 9 Tieren, die CT und BSA auf der Haut erhalten hatten, Titer über 100 ELISA-Einheiten. Von den Tieren, die Antigen und Adjuvanz erhalten hatten, entwickelten die Mäuse, denen das Material auf der gleichen Seite (linkes Ohr) gegeben worden war, höhere (10-fach) Anti-BSA-Titer als die Tiere, die Antigen und Adjuvanz auf verschiedenen (linkes und rechtes) Ohren erhalten hatten. Die Tiere, die Antigen auf einem Ohr und Adjuvanz auf dem anderen Ohr erhalten hatten, entwickelten jedoch eine Anti-BSA Immunantwort, die ungefähr 30-mal höher war als in Tieren, denen BSA allein gegeben wurde. Antigen und Adjuvanz können daher während der TCI an verschiedenen Stellen topisch aufgetragen werden, um eine humorale Immunantwort auszulösen. Es wird erwartet, dass diese Immunstimulation mit Antigen auftreten kann, das über verschiedene Wege transportiert wird, und man kann sich Schemata vorstellen, einschließlich oraler, bukkaler, nasaler, rektaler, vaginaler, intradermaler, durch Kanonen oder anderer Mittel des Transports. Zusätzlich können Adjuvanzien mit Nukleinsäureimmunisierung verwendet werden, um die Antwort zu verstärken. Ein solcher Transport muss nicht notwendigerweise gleichzeitig erfolgen, um die Immunantwort zu verstärken. Zum Beispiel kann eine im. Injektion von Plasmid-DNA später durch transkutanes Verabreichen eines Adjuvanz gefolgt werden. Immunstimulation durch CT, LT, TNFa, CpGs oder ähnlichen Adjuvanzien ist ein überraschendes Ergebnis, weil gedacht wurde, dass Moleküle von 5000 Daltons die Haut nicht durchdringen können.

Tabelle 13. Transport von Antigen und Adjuvanz an der gleichen oder entfernten Stelle(n) auf der Haut mit Penetrationsförderung.

Anti-BSA-IgG (H+L) ELISA-Einheiten			
Tier Nr.	Adjuvanz / Antigen	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 12
Gruppe G	BSA linkes Ohr		240
Gruppe G	BSA linkes Ohr		99
Gruppe G	BSA linkes Ohr		40
Gruppe G erhältlich	BSA linkes Ohr		nicht
Gruppe G	BSA linkes Ohr		15
Geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		6	61
Gruppe C	CT/BSA linkes Ohr		16418
Gruppe C	CT/BSA linkes Ohr		24357
Gruppe C	CT/BSA linkes Ohr		13949
Gruppe C	CT/BSA linkes Ohr		70622
Gruppe C	CT/BSA linkes Ohr		nicht erhältlich
Geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		3	25053
Gruppe A	CT linkes/BSA rechtes Ohr		106
Gruppe A	CT linkes/BSA rechtes Ohr		23806
Gruppe A	CT linkes/BSA rechtes Ohr		1038
Gruppe A	CT linkes/BSA rechtes Ohr		1163
Gruppe A	CT linkes/BSA rechtes Ohr		8696
Geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		15	1939

Beispiel 14. Transkutane Immunisierung bei Menschen

[0148] Die Erfindung kann unter Verwendung eines geeigneten Vehikels oder Trägers ausgeführt werden. Zum Beispiel kann eine Auflage als ein solches Vehikel verwendet werden und kann mit der erfindungsgemäß hergestellten Formulierung behandelt werden oder kann dazu verwendet werden, die Hautfläche abzudecken, die mit der erfindungsgemäß hergestellten Formulierung behandelt wurde. Eine geeignete Auflage kann beispielsweise aus Baumwolle, Nylon, Kunstseide, Polyester oder Kombinationen davon hergestellt werden. Solche Auflagen können mit einer klebenden oder nichtklebenden Rückseite bereitgestellt werden. Auflagen mit einer nichtklebenden Rückseite können durch nichtklebende Mittel an dem Tier befestigt werden, wie beispielsweise durch Wickeln. Geeignete Rückseiten können zum Beispiel aus Materialien wie Silikon, Acrylat oder Gummi hergestellt werden. Andere Vehikel oder Träger schließen die oben aufgelisteten ein, wie zum Beispiel Pulver, Öle, Wasser, Creme und ähnliches. Um das Potential der TCI bei Menschen einzuschätzen, wurde eine Phase 1 Studie unter Verwendung von LT durchgeführt, um zu versuchen, Serum Anti-LT Antikörper zu induzieren. Sechs Freiwillige erhielten eine Dosis von 100 µg LT, eine Dosis ähnlich der von oralen Adjuvanzdosen, die für Choleravakzine verwendet werden (1 mg CTB). LT wurde unter GMP-Bedingungen im Swiss Serum and Vaccine Institute (Bern, Schweiz) hergestellt und wurde durch Oravax Inc., Cambridge, MA, bereitgestellt. Die Freiwilligen erhielten 500 µg LT, gemischt mit 500 µl steriler Salzlösung, die auf einer 2 in² Baumwollgazeauflage mit Polyvinylrückseite absorbiert war und durch eine 4 × 4 in² Tegaderm™ Wundauflage bedeckt wur-

de. Die Immunisierung wurde durch Platrieren der Auflage auf nichtmanipulierter Haut für 6 Stunden durchgeführt, danach wurde die Stelle gründlich mit 500 ml steriler Salzlösung abgespült. Die Personen wurden nach 12 Wochen in ähnlicher Weise erneut immunisiert. Die Freiwilligen wurden nach Tag 1, 2, 3 und 7 auf Zeichen von Entzündung an der Stelle der Immunisierung untersucht und nach Symptomen, die mit der Vakzinierung zusammenhängen, gefragt. Die Immunisierung wurde durch Platrieren der Auflage auf nichtmanipulierter Haut für 6 Stunden durchgeführt, danach wurde die Auflage entfernt und die Stelle gründlich mit Salzlösung gespült. Die Personen wurden nach 12 Wochen erneut immunisiert. Es wurden keine Nebenwirkung beobachtet, weder systemisch noch an der Stelle der Immunisierung nach der ersten oder zweiten Immunisierung. Anti-LT IgG-Titer wurden, wie vorher beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten (EE) angegeben, die definiert sind als die inverse Verdünnung einer Probe, die eine OD von 1,0 ergibt. Anti-LT-IgA wurde in gleicher Weise bestimmt wie Anti-LT-IgG unter Verwendung von Ziege-Anti-Mensch-IgG (α)-HRP (Kirkegaard und Perry, Gaithersburg, MD) gegen eine Standard IgA-Kurve, die unter Verwendung von menschlichem IgA (ICN) hergestellt wurde. Wie in Tabelle 14 gezeigt, sprachen 6 von 6 Personen durch Hervorbringen eines Anstiegs der Serum Anti-LT-IgG- oder IgA-Antikörper an, definiert als ein vierfacher Anstieg in Antikörpertitern. Der mittlere vielfache Anstieg an Anti-LT-IgG betrug 10,2, der mittlere vielfache Anstieg an Serum Anti-LT-IgA betrug 7,2. Die Biopsien von der Immunisierungsstelle und dem kontralateralen Arm zeigten keine Zeichen von Entzündung der Haut. Diese Ergebnisse bestätigen, dass TCI im Menschen ohne Hautirritationen oder Entzündung durchgeführt werden kann.

[0149] Geeignete Auflagenmaterialien sind bereits beschrieben worden. Im Allgemeinen kann die Auflage beispielsweise aus einer drucksensitiven Wundauflage, einer Grundsubstanz für eine absorbierende Schicht, die Vakzinien und Adjuvanz trägt, einer vakzineundurchlässigen Rückseite und einer Abgabeschicht bestehen. Diese und andere geeignete Auflagenbeispiele sind beschrieben in dem US Patent Nr. 4,915,950 und 3,734,097.

[0150] Die Auflagen können so hergestellt werden, dass sie gewebte und nichtgewebte Grundsubstanzen von Materialien einschließen, die beispielsweise Polyester/Zellulose, Polypropylen, Polyester, Polyester/Kunstseide und ähnliches einschließen.

[0151] Beispiele für nichtgewebte Auflagengrundsubstanzen können einschließen:

BBA Vliese

- a. Sorte # 1313290, nass beschichtetes Vlies, Zusammensetzung = Polyesterzellulose, Gewicht (gsy) = 35,4, Gewicht (gsm) = 42,3, Dicke (mils) = 7,9, Stabilität MD = 3,4, Stabilität CD = 2,4.
- b. Sorte # 2006086, termisch gebundenes Vlies, Zusammensetzung = Polypropylen, Gewicht (gsy) = 16,0, Gewicht (gsm) = 19,1, Dicke (mils) = 10,2, Stabilität MD = 3,3, Stabilität CD = 0,7.
- c. Sorte # 149146, termisch gebundenes Vlies, Zusammensetzung = Polyester, Gewicht (gsy) = 25,6, Gewicht (gsm) = 30,6, Dicke (mils) = 6,5, Stabilität MD = 5,3, Stabilität CD = 0,9.
- d. Sorte # 149020, termisch gebundenes Vlies, Zusammensetzung = Polyester/Kunstseide, Gewicht (gsy) = 30,5, Gewicht (gsm) = 36,4, Dicke (mils) = 13,2, Stabilität MD = 5,5, Stabilität CD = 1,1.
- e. Sorte # 140-027, hydroverschlungenes Vlies, Zusammensetzung = Polyester/Kunstseide, Gewicht (gsy) = 28,0, Gewicht (gsm) = 33,5, Dicke (mils) = 22,4, Stabilität MD = 10,4, Stabilität CD = 3,8.

[0152] Ein drucksensitives Haftmittel, das in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, schließt beispielsweise Haftmittel, basierend auf Acrylat, Silikon, Gummi und ähnlichem, ein.

Tabelle 14. Mittlerer vielfacher Anstieg an menschlichem Anti-LT-IgG und IgA

Freiwilliger Nr.	Woche 4 IgG	Woche 12 IgG	Woche 16 IgG
13	15,2	9,5	12,5
14	1,4	1,6	1,7
15	11,7	15,0	12,9
16	1,3	0,7	16,0
17	12,5	51,9	58,6
18	1,3	2,1	4,3
mittlerer Anstieg IgG	4,2	5,0	10,2

Freiwilliger Nr.	Woche 4 IgA	Woche 12 IgA	Woche 16 IgA
13	7,2	4,1	10,1
14	4,9	4,3	4,3
15	4,9	5,7	4,5
16	1,4	1,3	7,0
17	15,3	29,4	28,1
18	1,3	1,5	3,5
mittlerer Anstieg IgA	4,1	4,2	7,2

Beispiel 15.

[0153] Es wurde gezeigt, dass LT wirksam für die Immunisierung von Menschen über den transkutanen Weg ist. Wir haben auch herausgefunden, dass LT als ein Adjuvant für TCI wirkt. 6 bis 8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden anästhesiert und rasiert, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Am Tag der Immunisierung wurden die Rücken der Mäuse mit Isopropanol abgewischt. Nachdem der Alkohol evapiert war (ungefähr 5 Minuten) wurden 100 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), enthaltend 100 µg des hitzelabilen Enterotoxins (LT) und/oder 100 µg Diphtherietoxoid (DT) auf dem Rücken für 90 bis 120 Minuten aufgetragen. Das Entfernen des überschüssigen Antigens wurde durchgeführt, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Die Immunisierung wurde 4 und 8 Wochen später wiederholt. 10 Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen und die Anti-DT-Titer unter Verwendung eines ELISA, wie oben beschrieben für "ELISA-IgG (H + L)", bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 gezeigt.

[0154] Die Anti-DT-Titer im Serum von Tieren, die mit LT und DT immunisiert wurden, waren eindeutig erhöht im Vergleich zu Titern im Serum von Tieren, die mit DT allein behandelt wurden, und jenen im Serum von Kontrollblutproben vor Immunisierung. Es hat daher den Anschein, dass das hitzelabile Enterotoxin (LT) als Adjuvant auf der Haut verwendet werden kann.

Tabelle 15. Verwendung von hitrelabilem Enterotoxin (LT) von *E. coli* als Adjuvant auf der Haut.

Anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten			
Tier Nr.	Adjuvant / Antigen	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 10
51	DT		11
52	DT		7
53	DT		4
54	DT		8
55	DT		7
Geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		4	7
71	LT/DT		7126
72	LT/DT		46909
73	LT/DT		669
74	LT/DT		8480
75	LT/DT		1598
Geometrisches Mittel vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		5	4970

Beispiel 16.

[0155] Um die Rolle der physikalischen/mechanischen Penetrationsförderung abzuschätzen, wurden die oberflächigen Schichten des Stratum Corneum durch Abziehen (Abreißen) von Klebeband entfernt. Das Abreißen von Klebeband ist ein Eingreifen, das im Stand der Technik gut bekannt ist, um die äußere Schicht des Stratum Corneum zu entfernen. 6 bis 8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden anästhesiert und rasiert, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Vierundzwanzig Stunden später wurde CT (25 µg) in 50 µl phosphatgepufferter Salzlösung auf die Rücken der Mäuse aufgetragen; „keine“ Eingriffsgruppe. Als Alternative wurde die Haut auf den Rücken einer zweiten Gruppe von Tieren sanftem Klebebandabreißen ausgesetzt; „Klebebandabreißen“ Eingriffgruppe. Das Abreißenverfahren wurde durch Anbringen von Scotch Cellophan-Klebeband auf die Rücken, auf die Hautoberfläche binden lassen für 3 Minuten, gefolgt durch sanftes Entfernen des Klebebands, durchgeführt. Die Binden-/Entfernen-Schritte wurden 3-mal wiederholt. CT (25 µg) in 50 µl phosphatgepufferter Salzlösung wurde dann auf die Rücken der Mäuse aufgetragen. Das Antigen verblieb für ungefähr 1,5 Stunden auf den Rücken, zu diesem Zeitpunkt wurde das Entfernen des überschüssigen Antigens durchgeführt, wie beschrieben im „Immunisierungsverfahren“.

[0156] Die Anti-CT Antikörpertiter wurden unter Verwendung von ELISA, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H + L)“, bestimmt unter Verwendung von Seren, die 11 Tage nach der ersten Immunisierung entnommen wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 gezeigt. CD war immunogen in beiden Gruppen, verglichen mit Seren, die vom gleichen Tier vor der Immunisierung (Kontrollblut vor Immunisierung) entnommen wurden. Das geometrische Mittel im Titer der mit Klebebandabreißen behandelten Gruppe war jedoch 100-fach höher, und die Titer waren in der letztgenannten Gruppe von Tieren einheitlicher im Vergleich zu den „keine“ Tieren. Es hat daher den Anschein, dass physikalische Störung der Hautoberfläche unter Verwendung von Klebebandabreißen den Transfer von Antigen über den transkutanen Weg fördert.

[0157] Diese einfache Vorrichtung kann durch andere Vorrichtungen zur physikalischen Penetration ersetzt werden, um Antigene und Adjuvantien in die Epidermis einzubringen, wie eine Nadel und Tuberkulinspritze, die für intradermale Injektion verwendet werden, Mikronadeln, die eine Länge aufweisen, die nur das Stratum Corneum oder die oberflächliche Epidermis durchdringen, Vorrichtungen, die für den TB-Zackentest verwendet werden, gasbetriebene Kanonen, Klebeband für die Abrissmethode, oder andere Vorrichtungen, von denen

bekannt ist, dass sie nur die Epidermis oder oberflächliche Dermis durchdringen. Klebebandabreißvorrichtungen können zusammen mit anderen Penetrationsförderern verwendet werden. Klebebandabreißvorrichtungen können zusammen mit einem Marker verwendet werden, um die Stelle für die Platzierung der Auflage abzugegrenzen, und können in einer Rolle oder individuellen Einheiten verabreicht werden.

Tabelle 16. Förderung der transkutanen Immunisierung durch physikalische Penetrationsförderung: Anti-CT-Titer in Mäusen, denen die Haut unter Verwendung von Cellophan-Klebeband vor dem Auftragen des Antigens abgerissen wurde.

Anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten			
Tier Nr.	Eingriff	Kontrollblut vor Immunisierung	Tag 11
976	keiner		155
977	keiner		4
978	keiner		4
979	keiner		31
980	keiner		23
Geometrisches Mittel			16
Kontrollblut vor Immunisierung			2
986	Klebebandabreißen		10702
987	Klebebandabreißen		1285
988	Klebebandabreißen		5832
989	Klebebandabreißen		997
990	Klebebandabreißen		782
Geometrisches Mittel			2990
Kontrollblut vor Immunisierung			3

Beispiel 17.

[0158] Es können Nukleinsäuren wie Plasmid-DNA oder RNA verwendet werden, um eine Immunantwort zu induzieren, und sind im Stand der Technik gut bekannt. Die Verwendung von Nukleinsäuren in transkutaner Immunisierung wurde in früheren Patenten beschrieben (PCT/US97/21324). Die Verwendung von Nukleinsäuren (auch als genetische Immunisierung bekannt) auf der Haut mit Penetrationsförderungstechniken wird in dem folgenden Beispiel veranschaulicht.

[0159] 6 bis 8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden anästhesiert und rasiert wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Für die "NP DNA"-Gruppe wurden die Mäuse mit Isopropanol abgewischt, nachdem der Alkohol evaporiert war (ungefähr 10 Minuten) wurden die Rücken mit Wasser unter Verwendung eines gesättigten Gazetupfers hydratisiert. Ungefähr 10 Minuten später wurde das überschüssige Wasser abgetupft und 100 µg eines DNA-Plasmids (pCMV-NP), welches das Influenza-Nukleoprotein kodiert, wurden auf dem Rücken in 100 µl Salzlösung aufgetragen. Die zweite Gruppe von NP-DNA Mäusen wurden dem gleichen Immunisierungsprotokoll ausgesetzt mit der Ausnahme, dass die Rücken durch 3 x Klebebandabreißen vor dem Alkoholbetupfen behandelt wurden; "NP DNA-Klebebandabreißen". Das Klebebandabreißverfahren wurde durch Anbringen von Scotch Cellophan-Klebeband auf die Rücken erzielt, Bindenlassen auf der Hautoberfläche für 5 Minuten, gefolgt durch sanftes Entfernen des Klebebands. Eine dritte Gruppe von Mäusen wurde in das beschriebene Klebebandabreiß-/Immunisierungsprotokoll eingebunden, und 100 µg des adjuvanten hitzelabilen Enterotoxins (LT) wurden in die Immunisierungslösung eingeschlossen. 16 Tage nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen und die Anti-Influenza-NP-Titer unter Verwendung eines ELISAs, wie beschrieben für "ELISA-IgG (H + L)", bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 gezeigt.

[0160] Anti-Influenza-Titer wurden unter Verwendung einer gespaltenen Virusantigen (Fluzon) Zubereitung, um die ELISA-Platten zu beschichten, bestimmt. Die ELISA-Titer wurden in fünf individuellen Tieren bestimmt, und der mittlere optische Dichtewert für jede Gruppe ist gezeigt. Alle drei Immunisierungsgruppen entwickelten

Anti-Influenza-Titer im Vergleich mit Titern im Serum, das vom gleichen Tier vor der Immunisierung (Kontrollblut vor Immunisierung) abgenommen wurde. Im Vergleich mit der „NP DNA alleine“ Gruppe förderte das Klebebandabreißen vor der Immunisierung den Anti-Influenza-Titer in allen drei Serumverdünnungen, die getestet wurden (1 : 100, 1 : 200, 1 : 400), und die Zugabe eines Adjuvanz (LT) verstärkte diese Antwort weiter. Daher kann DNA auf der Haut verwendet werden, um Immunantworten auf Vakzineantigene zu induzieren und ihre Wirksamkeit kann durch die Zugabe von Adjuvanz, und Penetrationförderung wie Klebebandabreißen verstärkt werden.

Tabelle 17. Immunogenität von DNA, die als Antigen auf die Haut aufgetragen wurde unter Verwendung von Alkoholpenetrationsförderung.

Anti-INF-IgG optische Dichte (405 nm)					
Antigen/ Adjuvanz	Eingriff	Kontrollblut vor Immunisierung		Tag 16 nach Immunisierung	
		1:100	1:100	1:200	1:400
NP DNA	keiner	0,21	0,47	0,20	0,07
NP DNA	Klebebandabreißen	0,39	0,64	0,28	0,13
NP DNA/LT	Klebebandabreißen	0,39	0,87	0,38	0,13

Beispiel 18.

[0161] Die transkutane Immunisierung (TCI) ermöglicht wegen des einfachen Transfers, dass die Anwendung über verschiedene entwässernde Lymphknoten gegeben wird. Dies kann einen zusätzlichen Vorteil darstellen, da es die Immunantwort verstärkt. Kaninchen wurden anästhesiert, rasiert und wie oben beschrieben immunisiert. Die Tiere wurden mit 100 µg Choleratoxin (CT) und 100 µg Influenzahämagglutinin (HA) an einer Stelle oder an zwei Stellen auf dem Rücken immunisiert. HA und CT wurden bei 0, 3 und 5 Wochen aufgetragen. Sieben Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen und die Anti-HA-Titer unter Verwendung eines ELISAs, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (N + L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 gezeigt.

[0162] Die Anti-NA-Titer waren im Serum von 10 von 10 Tieren, die mit CT und HA immunisiert worden waren, im Vergleich zu Titern im Serum der gleichen Tiere vor der Immunisierung (Kontrollblut vor der Immunisierung), erhöht. Das geometrische Mittel des Titers in der Zwei-Stellen-Gruppe war dreifach höher als das in der Eine-Stelle-Gruppe, was nahe legt, dass der Antigentransfer an mehreren Stellen dazu verwendet werden kann, TCI zu verstärken. Daher können Antigene durch TCI eingebracht werden entweder an einer einzelnen oder an mehreren Stellen auf der Haut.

Tabelle 18. Transkutaner Transfer von Antigen in einer einzelnen oder mehreren Stellen.

Tier	Antigen/Adjuvanz	Anti-HA-IgG (ELISA-Einheiten)		
		Kontrollblut vor der Im- munisierung	7 Wochen	geometrisches Mittel
1	CT/HA eine Stelle	< 25	1142	2596
2	CT/HA eine Stelle	< 25	9617	
3	CT/HA eine Stelle	< 25	2523	
4	CT/HA eine Stelle	< 25	2275	
5	CT/HA eine Stelle	< 25	1869	
6	CT/HA zwei Stellen	< 25	10348	8403
7	CT/HA zwei Stellen	< 25	18453	
8	CT/HA zwei Stellen	< 25	9778	
9	CT/HA zwei Stellen	< 25	15985	
10	CT/HA zwei Stellen	< 25	1404	

Beispiel 19.

[0163] Die Vielzahl von Antigenen, die durch TCI eingebracht werden kann, wird weiter durch die Verwendung einer Polysaccharid konjugierten Vakzine veranschaulicht, um Anti-Polysaccharidantikörper zu induzieren. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden anästhesiert, rasiert und immunisiert, wie in dem Immunisierungsverfahren beschrieben. Die Mäuse wurden mit Choleratoxin (CT) und *Haemophilus influenzae* B Polysaccharid (Hib-PS) bei 0, 3 und 5 Wochen immunisiert. Sieben Wochen nach der ersten Immunisierung wurden den Tieren eine Blutprobe entnommen und die Anti-Hib-PS-Titer wurde unter Verwendung eines ELISAs, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H + L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 gezeigt.

[0164] Anti-Hib-PS-Titer waren im Serum von 4 von 10 Tieren, die mit CT und Hib-PS immunisiert worden waren, erhöht im Vergleich zu Titern im Serum von den gleichen Tieren vor der Immunisierung (Kontrollblut vor Immunisierung). Daher kann TCI verwendet werden, um Anti-Polysaccharidantigene durch die Haut zu induzieren. Dies ist ein häufiges Vakzineantigen für menschliche Verwendung und repräsentiert eine wichtige Strategie für die Immunisierung.

Tabelle 19. Transfer eines konjugierten Polysaccharids durch transkutane Immunisierung.

Ohrmarke Nr.	Antigen/Adjuvanz	Anti-Hib PS IgG (μ g/ml)	
		Kontrollblut vor der Immunisierung	7 Wochen
1	CT/Hib-PS (100 μ g/100 μ g)	< 0,20	< 0,20
2	CT/Hib-PS (100 μ g/100 μ g)	< 0,20	< 0,20
3	CT/Hib-PS (100 μ g/100 μ g)	< 0,20	<u>1,68</u>
4	CT/Hib-PS (100 μ g/100 μ g)	< 0,20	< 0,20
5	CT/Hib-PS (100 μ g/100 μ g)	< 0,20	<u>1,86</u>
6	CT/Hib-PS (100 μ g/25 μ g)	< 0,20	<u>1,04</u>
7	CT/Hib-PS (100 μ g/25 μ g)	< 0,20	< 0,20
8	CT/Hib-PS (100 μ g/25 μ g)	< 0,20	< 0,20
9	CT/Hib-PS (100 μ g/25 μ g)	< 0,20	<u>6,30</u>
10	CT/Hib-PS (100 μ g/25 μ g)	< 0,20	< 0,20

Beispiel 20.

Transkutane Immunisierung von Mäusen mit Vakzineantigenen für menschliche Verwendung

[0165] Es ist gezeigt worden, dass CT als Adjuvanz für transkutane Immunisierung mit einzelnen Toxoiden und BSA wirken kann. Wir haben Mäuse transkutan immunisiert mit einer Vielzahl von Vakzineantigenen für menschliche Verwendung, einschließlich einer multivalenten Toxoidvakzine (Tetanus und Diphtherietoxoide), einem hefeexprimierten rekombinanten Protein (HIV p55 gag) und gesamter, abgetöteter Rabiesviren unter Verwendung von CT als Adjuvanz, wie in Tabelle 20 gezeigt. BALB/c Mäuse ($n = 5$) wurden immunisiert und zweimal aufgefrischt, wie vorher beschrieben (Glenn, G. M., Scharton-Kersten, T., Vassell, R., Matyas, G. T Alving, C. R. Transcutaneous immunization using bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants. Infect. Immun.) (im Druck). Immunisierungsdosen schlossen 100/50/50 μ g CT/TT/DT über TCI gegen 3/1/1 für Alaun/TT/DT IM; 100/100 μ g für LT + DT gegen 100 μ g DT allein ein. 100/100 μ g für CT/p55 über TCI gegen 100 μ g p55 allein. Mäuse, die mit 17 IE des abgetöteten Rabiesvirus ($n = 10$) immunisiert worden waren, wurden 2 \times intramuskular erstimmunisiert und dann transkutan (17 IE) aufgefrischt nach leichtem Alkoholwischen der Haut und mit 3 \times IM Rabies-Immunisierung verglichen. Es wurden Antikörperspiegel gegen DT, TT, p55 und Rabies bestimmt unter Verwendung eines ELISA, wie vorher beschrieben (Grassi, M. Wandler, A. & Peterhans, E. Enzyme-linked immunoabsorbant assay for determination of antibodies to the envelope glycoproteins of rabies virus. J. Clin. Microbiol. 27, 899–902 (1989). Miyamura, K., Tajiri, E., Ito, A., Murata, R. & Kono, R. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. II. Comparison with the rabbit skin method and practical application for seroepidemiological studies. J. Biol. Stand. 2, 203–209 (1974)). TCI ergab ähnliche Anstiege in den Antikörper-Antworten auf TT und DT und die Anti-DT-Neutralisationstiter waren vergleichbar zu jenen, die durch intramuskuläre Immunisierung (IM) hervorgerufen wurden. Diese Daten zeigen, dass TCI verwendet werden kann, um eine Immunantwort von vergleichbarer Stärke zu induzieren wie solche, die durch existierende Immunisierungsverfahren induziert werden. TCI-Auffrischung von Tieren, die erstmals IM immunisiert wurden, ergaben auch einen signifikanten Anstieg in Anti-Rabies-Titern in allen 10 getesteten Tieren (0,53 bis 1,03 IU, $p < 0,02$, Student's t-test). Die Antikörper gegen die Antigene DT und p55, die ohne Adjuvanz verabreicht wurden, waren sehr niedrig oder nicht nachweisbar oder in Übereinstimmung mit unseren früheren Beobachtungen, dass Antigene nur schwach immuno-

gen sind, wenn sie ohne Adjuvanz aufgetragen werden. LT wirkte auch als Adjuvanz (Tabelle 20) in ähnlicher Weise zu vorherigen Studien unter Verwendung von CT (1,2). Obwohl die Immunisierungen nicht optimiert worden waren im Vergleich zu intramuskulärem Transfer, bestätigen diese antigenspezifischen Antworten, dass TCI verwendet werden kann für eine Vielzahl von Vakzinien für menschliche Verwendung aus einer Vielzahl von Quellen und einer Vielzahl von Größen, so dass LT als Adjuvanz für gemeinsam verabreichte Vakzineantigene wirken kann.

Tabelle 20. Mausantikörperantworten auf Vakzineantigene für menschliche Verwendung verabreicht durch TCI.

Immunisierung des/r Antigen/s/e für TCI Einheiten)	Antikörperspezifität	TCI (ELISA-Einheiten)	IM/Alaun (ELISA-
CT+TT+DT	Anti-DT	135.792 (86.552-146.759)	85.493 (24.675-238.904)
CT+TT+DT	Anti-TT	30.051 (13.863-53.174)	94.544 (74.928-113.408)
CT+TT+DT	Diphtheria Toxin Neutralisierung	404 (22-2.816)	1.226 (352-11.264)
LT+DT	Anti-DT	4976 (669-46.909)	ND
CT+HIV p55 gag	Anti-p55	10,603 (1.063-52.579)	ND
CT+ abgetötetes Rabiesvirus	Anti-G Protein	1,03 (IU/ml) (0,31-2,77)	7,54 (IU/ml) (3,31-17,47)

[0166]

ND nicht durchgeführt
ELISA-Einheiten (EE) gezeigt als geometrisches Mittel und Bereich in Klammern

Beispiel 21.

Langerhans'sche Zellaktivierung

[0167] Bei zwei Versuchspersonen wurde die Immunisierungsstelle und der gegenüberliegende nicht-immunisierte Arm biopsiert, bei einer 24 Stunden nach der Immunisierung und bei einer 48 Stunden nach der zweiten Immunisierung. Eine Hämatoxilin und Eosin (H&E) Färbung der Proben bestätigte die klinischen Beobachtungen, die nahe legten, dass keine Entzündung nach der Immunisierung zu sehen war (Fig. 1A, B). Obwohl die routinehistologischen Schnitte unauffällig waren, zeigten LCs, die unter Verwendung von Anti-CD1a Färbung der Proben von der Immunisierungsstelle sichtbar gemacht wurden, stark vergrößerte Zellkörper, aber andererseits normale Anzahl von Zellen im Vergleich zu den Kontrollbiopsien vom gegenüberliegenden Arm sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden (Fig. 1C, D, E, F). Ähnliche Beobachtungen wurden unter Verwendung von Anti-HLA-DR und Anti-S-100 gesehen, um LCs sichtbar zu machen (nicht gezeigt). Die LC-Morphologie in der TCI-immunisierten Haut hatte ein ähnliches Erscheinungsbild wie mandelkryptische LCs, von denen angenommen wird, dass sie chronisch sind durch Lipopolysaccharide aus der Mundflora (Noble) aktiviert.

[0168] Wegen der begrenzten Größe und Anzahl von menschlichen Haut-Biopsieproben, die untersucht wurden, sind komplementäre Mausstudien durchgeführt worden. LC-Aktivierung in Maussystemen bei Verwendung von Kontaktensensibilatoren, LPS und entründungsfördernden Cytokinen, ist gekennzeichnet durch sowohl

Änderungen in der Morphologie (Aiba) als auch durch die Erhöhung der Expression von Oberflächenmarkern (Jakob und Udey). Mausohrenhaut wird häufig für Studien der LC-Aktivierung verwendet, und es ist gezeigt worden, dass dies eine hervorragende Stelle für transkutane Immunisierung ist (Scharton-Kersten). Epidermale Schichten wurden 24 Stunden nach dem Auftragen von CT auf das Ohr präpariert und auf MHC Klasse II gefärbt, einem Marker in der Maushaut, der auf LC beschränkt ist. Im Vergleich zu den PBS-behandelten Ohren, **Fig. 2A**, zeigten LC in CT-behandelten Ohren merkliche Veränderungen in der LC-Morphologie mit Verlust von dentritischen Fortsätzen, vergrößerten Zellkörpern und intensiver Anfärbung der Zellen – Merkmale der LC-Aktivierung (Alba) (**Fig. 2B, C**). Das LC-Aktivierungspotenzial von CT wurde unter Verwendung von Durchfluss-Zytometrie bestätigt. LC aus CT-behandelter Haut exprimierten erhöhte Spiegel von MHC Klasse II Antigenen und CD 86 (B7-2) und verringerte Spiegel von E-Cadherin, was mit LC-Aktivierung übereinstimmt, wie an anderer Stelle beschreiben (Pierre, Aiba, Jakob).

[0169] Immunisierungsverfahren, das für Beispiel 22 verwendet werden kann.

[0170] BALB/c Mäuse können mit #40 Haarschneidegerät rasiert werden. Dieses Rasieren kann durchgeführt werden ohne irgendwelche Zeichen von Verletzung der Haut. Das Rasieren kann durchgeführt werden von der Mitte des Brustkorbs bis gerade unterhalb des Nackens. Die Mäuse können dann für 24 Stunden ruhen gelassen werden. Zuvor könnten die Mäuse zur Identifizierung am Ohr markiert werden und eine Blutprobe entnommen werden, um ein Prä-Immunserum zu erhalten. Die Mäuse können auch transkutan immunisiert werden, ohne Rasieren durch Auftragen von 5–500 µl der Immunisierungslösung auf jedes Ohr. Die Mäuse könnten in der folgenden Weise immunisiert werden. Die Mäuse könnten mit 0,03–0,06 ml einer 20 mg/ml Lösung von Xylazin und 0,5 ml und 100 mg/ml Ketamin anästhesiert werden und durch diese Anästhesiedosis für ungefähr 1–3 Stunden immobilisiert werden. Die Mäuse könnten mit der Bauchseite nach unten auf einer Wärmedecke platziert werden.

[0171] Die Immunisierungslösung und Penetrationsförderungsverbindung (oder Technik) können auf der dorsalen rasierten Haut einer Maus in der folgenden Weise platziert werden: Ein 1,2 cm × 1,6 cm aus Polystyren gefertigter Stempel wird sanft auf den Rücken gelegt und eine mit Salzlösung benetzte sterile Gaze könnte verwendet werden, um die Haut teilweise anzufeuchten (was die gleichmäßige Auftragung der Immunisierungslösung erlaubt), die Immunisierungslösung könnte dann mit einer Pipette aufgetragen werden auf das Gebiet, das durch den Stempel abgegrenzt wird, um einen 2 cm² Bereich mit Immunisierungslösung zu erhalten. Es könnte Sorgfalt angewandt werden, um die Haut mit der Pipettenspitze nicht zu kratzen oder zu reiben. Die Immunisierungslösung könnte über das Gebiet, das abgedeckt werden soll, mit der glatten Seite der Pipettenspitze verteilt werden. Als Alternative könnte die Immunisierungslösung direkt auf der Haut ohne Anfeuchten oder mit Anfeuchten, ohne die Verwendung eines Stempels, platziert werden.

[0172] Die Immunisierungslösung (zwischen ungefähr 5 µl und ungefähr 200 µl) könnte für 60 bis 120 Minuten auf dem Rücken der Maus belassen werden. Am Ende der Immunisierungszeit könnte die Maus sanft am Nacken und am Schwanz unter einem reichlichen Strom von lauwarmem Leitungswasser gehalten und für 10 Sekunden gewaschen werden. Die Maus könnte dann sanft mit einem Stück steriler Gaze trockengetupft werden, und ein zweites Waschen könnte dann für 10 Sekunden durchgeführt werden; die Maus könnte dann ein zweites Mal trockengetupft und im Käfig gelassen werden. Die Maus würde keine ungünstigen Wirkungen der Anästhesie, Immunisierung, Waschverfahren oder Toxizität der Exotoxine zeigen. Es würde nach der Immunisierung keine Hautirritation, Anschwellung oder Rötung zu sehen sein, und die Maus würde zu gedeihen scheinen. Eine Immunisierung unter Verwendung des Ohrs könnte, wie oben beschrieben, durchgeführt werden mit der Ausnahme, dass das Fell nicht vor der Immunisierung entfernt werden würde.

Antigen

[0173] Die folgenden Antigene könnten für Immunisierung und ELISA verwendet werden und könnten unter Verwendung von sterilem PBS oder normaler Salzlösung gemischt werden. Choleratoxin oder CT (List Biologicals, Katalog-Nr. 101B, Chargen-Nr. 10149CB), CT B-Untereinheiten (List Biologicals, Katalog-Nr. BT01, Chargen-Nr. CVXG-14E), CT A-Untereinheit (List Biologicals, Katalog-Nr. 102A, Chargen-Nr. CVXA-17B), CT A-Untereinheit (Calbiochem., Katalog Nr. 608562); salzfrees Pertussistoxin (List Biologicals, Chargen-Nr. 181120a); Tetanustoxoid (List Biologicals, Chargen-Nr. 1913a und 1915a); Pseudomonas Exotoxin A (List Biologicals, Chargen-Nr. ETA25a); Diphtherietoxoid (List Biologicals, Chargen-Nr. 15151); hitrelabiles Enterotoxin von *E. coli* (Sigma, Chargen-Nr. 9640625); Rinderserumalbumin oder BSA (Sigma, Katalog-Nr. 3A-4503, Chargen-Nr. 31F-0116); und *Hemophilus influenzae* B Konjugat (Connaught, Chargen-Nr. 6J81401).

ELISA-IgG (H + L)

[0174] Antikörper spezifisch für CT, LT, ETA, Pertussistoxin, Diphtherietoxoid, *Haemophilus influenzae* B Konjugat und BSA könnten bestimmt werden unter Verwendung von ELISA in einer Technik ähnlich der von Glenn et al. (1995).

Beispiel 22.

[0175] Die Aktivierung von LT kann unter Standardreaktionsbedingungen durchgeführt werden durch Inkubieren des LTs mit Trypsin (oder Trypsin immobilisiert auf Kugelchen) mit oder ohne reduzierenden Agentien (z. B. Dithiotheritol), um die Disulfidbrücken nahe der Trypsinspaltstelle aufzubrechen. Natives LT kann durch Inkubation von 100 µg Protein mit 0,1 µg Trypsin in einem Gesamtreaktionsvolumen von 100 µl für 45 min bei 37°C aktiviert werden. Als Alternative kann das Trypsin auf Kugelchen fixiert werden, und das LT kann über die Trypsinkugelchen eluiert werden. Die Trypsinspaltung kann durch SDS-PAGE (Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680–685) nachgewiesen werden. LT, entweder behandelt oder nicht-behandelt mit Trypsin, kann mit Puffer, enthaltend das Dithiothreitol, gemischt und für 5 min vor der SDS-PAGE Analyse auf 100°C erhitzt werden. Trypsinbehandeltes LT könnte ein proteolytisches Fragment von 21 K Daltons aufweisen in Übereinstimmung mit Trypsinspaltung des A1 und A2, was der A1-Untereinheit ermöglicht, G-Proteine zu ADP-ribosylieren und dadurch seine toxische Wirkung zu erzielen, während nicht-behandeltes LT übereinstimmend mit einer intakten A-Untereinheit bei 28 K Daltons eine Bande zeigen würde. Die Aktivierung kann weiterhin gezeigt werden durch den Maus-Y-1-Zelltest, in dem natives LT 1.000-fach weniger aktiv wäre als CT, aber Trypsinbehandeltes LT ebenso aktiv sein würde wie CT. Die Aktivierung kann auch unter Verwendung eines enzymatischen Assays gezeigt werden, dem NAD:Agmatin ADP-Ribosyltransferasetest. In einem solchen Test würde erwartet werden, dass nicht-Trypsinbehandeltes LT geringe oder nicht nachweisbare Aktivität zeigt, während man erwarten würde, dass Trypsin-behandeltes LT ähnliche Aktivität aufweist wie jene, die durch CT gezeigt wird.

Beispiel 23.

[0176] Die transkutane Immunisierung kann nützlicher sein, wenn die Immunisierung über einen kurzen Zeitraum ausgeführt werden kann. Es kann zum Beispiel für eine Immunisierung nützlich sein, dass sie während eines Routineklinikbesuchs, der 30 min dauert, durchgeführt werden kann. In diesem Beispiel zeigen wir, dass transkutane Immunisierung auf hydratisierter alkoholbetupfter Haut in einer solch kurzen Zeit durchgeführt werden kann.

[0177] 6 bis 8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden anästhesiert und rasiert, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Am Tag der Immunisierung wurden die Rücken der Mäuse mit Isopropanol abgewischt. Nachdem der Alkohol evapiert war (ungefähr 10 Minuten) wurden 200 µl Wasser auf den Rücken zur Hydratierung aufgetragen. 15 Minuten später wurde die Immunisierungslösung auf den Rücken aufgetragen und dort für die angegebene Zeit belassen. Das Entfernen des überschüssigen Antigens wurde durchgeführt, wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben. Die Mäuse wurden mit CT allein immunisiert (100 µg in 50 µl) bei d0 und mit CT plus DT (100 µg jeweils in 100 µl Volumen) bei 4, 6 und 9 Wochen. Zwölf Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen und die Anti-DT-Titer wurden unter Verwendung eines ELISAs, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H + L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 gezeigt.

[0178] Anti-DT-Titer waren deutlich erhöht im Serum von all den Tieren, die mit CT und DT immunisiert wurden waren im Vergleich zu Tieren im Serum der selben Tiere vor der Immunisierung (Kontrollblut vor der Immunisierung). Die maximale Wirkung der Immunisierung scheint in Tieren aufzutreten, die für einen Zeitraum von 60 Minuten vakziniert wurden, obwohl die Titer bei 30 und 120 Minuten ähnlich waren. Fünfzehn Minuten Immunisierung scheinen weniger wirksam zu sein, da die Titer in dieser Gruppe ungefähr 10-fach geringer waren als jene, die in der 30, 60 und 120-Minuten-Gruppen beobachtet wurden. Es hat daher den Anschein, dass TCI innerhalb von 15 Minuten nach Auftragen des Antigens erreicht werden kann.

Tabelle 23. Wirkung der Dauer der Antigen-Anwendung auf die humorale Immunität, induziert durch transkutane Immunisierung.

Ohrmarke Nr.	Dauer der Immunisierung	Anti-DT-IgG (ELISA-Einheiten)		
		Kontrollblut vor der Immunisierung	12 Wochen	geometrisches Mittel
361	15 min	6	214	300
362	15 min		664	
363	15 min		314	
364	15 min		181	
365	15 min		1594	
366	30 min	8	11953	13445
367	30 min		32478	
368	30 min		24346	
369	30 min		3457	
370	30 min		99776	
371	60 min	12	75787	107963
372	60 min		200768	
373	60 min		102592	
374	60 min		87034	
375	60 min		9210	
376	120 min	4	48132	48202
377	120 min		99362	
378	120 min		37308	
379	120 min		20355	
380	120 min		25149	

REFERENCES

- [0179] Alving, C. R., and Wassef, N. M. (1994) Cytotoxic T lymphocytes induced by liposomal antigens: Mechanisms of immunological presentation. *AIDS Res. Hum. Retro.*, 10 (sup. 2): S91–S94.
- [0180] Antel, J. P., et al. (1996) Immunotherapy for multiple sclerosis: From theory to practice. *Nature Medicine*, 2: 1074–1075.
- [0181] Ausubel, F. M., et al. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.
- [0182] Bathurst, I. C., et al. (1993) An experimental Vakzine cocktail for *Plasmodium falciparum* malaria. *Vakzine*, 11: 449–456.
- [0183] Blum, N. E. (1995) Variants of hepatitis B, C and D viruses: Molecular biology and clinical significance. *Digestion*, 56: 85–95.
- [0184] Bodanszky, M. (1993) *Peptide Chemistry*, Springer-Verlag, New York.
- [0185] Bos, J. D. (1997) The skin as an organ of immunity. *Clin. Exp. Immunol.*, 107 (suppl. 1): 3–5.
- [0186] Burette, W. N., et al. (1994) Recombinant microbial ADP-ribosylating toxins of *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, and enterotoxigenic *Escherichia coli*: Structure, function, and toxoid Vakzine Development. In: *Bioprocess Technology*, (Eds. Burette, W. N., et al.), pp. 185–203.
- [0187] Chang, S. P., et al. (1989) Generalized immunological recognition of the major merozoite surface antigen (gp 195) of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6343–6347.
- [0188] Chang, S. P., et al. (1992) A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. *J. Immunol.*, 139:

548–555.

- [0189] Chang, S. P., et al. (1994) Regulation of antibody specificity to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 by Adjuvant and MHC haplotype. *J. Immunol.*, 152: 3483– 3490.
- [0190] Clements, J. D., and Finkelstein, R. A. (1979) Isolation and characterization of homogenous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immunol.*, 24: 760–769.
- [0191] Craig, J. (1965) The effect of cholera stool and culture filtrates on the skin guinea pigs and rabbits, In: Proceedings of the Cholera Research Symposium, Honolulu, US Public Health Service Publication No 1328, pp. 153–158.
- [0192] Craig, J. (1972) Cutaneous Responses to Cholera Skin Toxin in Man. I. Responses in Unimmunized American Males, In: *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 125, No. 3, pp. 203–215.
- [0193] Dahl, M. V. (1996) Atopic dermatitis. In: *Clinical Immunodermatology*, 3rd Ed. Mosby, St. Louis, pp. 345–352.
- [0194] Delenda, C., et al. (1994) Analysis of C-terminally truncated dengue 2 and dengue 3 virus envelope glycoproteins: Processing in insect cells and immunogenic properties in mice. *J. Gen. Virol.*, 75: 1569–1578.
- [0195] Deprez, B., et al. (1996) Comparative efficiencies of simple lipopeptide constructs for in vivo induction of virus-specific CTL. *Vakzine*, 14: 375–382.
- [0196] Deutscher, M. P. (1990) *Guide to Protein Purification*, Academic Press, San Diego.
- [0197] Dickenson, B. L., and Clements, J. D. (1995) Dissociation of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect. Immun.*, 63: 1617– 1623.
- [0198] Dragunsky, E. M., et al. (1992) Experimental evaluation of antitoxic protective effect of new cholera Vakzines in mice. *Vakzine*, 10: 735–736.
- [0199] Elson, C. O., and Dertzbaugh, M. T. (1994) Mucosal Adjuvant. In: *Handbook of Mucosal Immunology* (Eds. Ogra, P. L., et al.) Academic Press, San Diego, p. 391.
- [0200] Finkelstein, R. A., and LoSpallutto, J. J. (1969) Pathogenesis of experimental cholera: Preparation and isolation of cholera and choleraenoid, *J. Exp. Med.* 130: 185–202.
- [0201] Fonseca, B. A., et al. (1994) Recombinant *Vakzinia* viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vakzine*, 12: 279–285.
- [0202] Frankenburg, S., et al. (1996) Effective immunization of mice against cutaneous leishmaniasis using an intrinsically adjuvanted synthetic lipopeptide Vakzine. *Vakzine*, 14: 923–929.
- [0203] Fries, L. F., et al. (1992a) Liposomal malaria Vakzine in humans: A safe and potent Adjuvant strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 358–362.
- [0204] Fries, L. F., et al. (1992b) Safety, immunogenicity, and efficacy of a *Plasmodium falciparum* Vakzine comprising a circumsporozoite protein repeat region peptide conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Infect. Immun.*, 60: 1834–1839.
- [0205] Glenn, G. M., et al. (1995) Murine IgG subclass antibodies to antigens incorporated in liposomes containing lipid A. *Immunol. Lett.*, 47: 73–78.
- [0206] Glenn, G. M., Scharton-Kersten, T., Vassell, R., Mallet, C. P., Hale, T. L. & Alving, C. R. Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J. Immunol.* 161,3211–3214 (1998).
- [0207] Glenn, G. M., Rao, M., Matyas G. R. & Alving, C. R. Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 391,851 (1998).
- [0208] Glenn, G. M., Scharton-Kersten, T., Vassell, R., Matyas, G. & Alving, C. R. Transcutaneous immunization using bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and Adjuvant. *Infect. Immun.* (in the press).
- [0209] Goeddel, D. V. (1990) *Gene Expression Technology*, Academic Press, San Diego.
- [0210] Gordon, Ada and Alistar Ramsey (1997) *Vakzine, Vakzination and the Immune Response*, Philadelphia, New York: Lipincott-Raven, pp. 13–14.
- [0211] Gregoriadis, G. (1993) *Liposome Preparation and Related Techniques*, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton.
- [0212] Herrington, D. A., et al. (1991) Safety and immunogenicity of a recombinant sporozoite malaria Vakzine against *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45: 695–701.
- [0213] Hollingsbee, D. (1995) Use of hydrocolloid patches, In: *Percutaneous Penetration Enhancers* (Eds., Smith, E. and Maibach, N.), CRC Press.
- [0214] Idson, B. (1978) Hydration and percutaneous absorption. *Curr. Prob. Dermatol.*, 7: 132– 141.
- [0215] Jahrling, P. B., et al. (1996) Passive immunization of Ebola virus-infected cynomolgus monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses. *Arch. Virol. Suppl.*, 11: 135– 140.
- [0216] Janeway, C. A., and Travers, P. (1996). *Immunobiology*, Churchill Livingstone, New York.
- [0217] Janson, J.-C., and Ryden, L. (1989) *Protein Purification*, VCH, New York.
- [0218] Katkov, W. N. (1996) Hepatitis Vakzines. *Med. Clin. North Am.*, 80: 189–200.
- [0219] Khusmith, S., et al. (1991) Protection against malaria by Vakzination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science*, 252: 715–718.

- [0220] Kounnas, M. Z., et al. (1992) The o2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *J. Biol. Chem.*, 267: 12420–12423.
- [0221] Kriegler, M. (1990) Gene Transfer and Expression, Stockton Press, New York.
- [0222] Krueger, K. M., and Barbieri, J. T. (1995) The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 34–47.
- [0223] Lee, A., and Chen, M. (1994) Successful immunization against gastric infection with *Helicobacter* species: Use of a cholera toxin B-subunit-whole-cell Vakzine. *Infect. Immun.*, 62: 3594–3597.
- [0224] Leung, D. Y. (1997) Atopic dermatitis: Immunobiology and treatment with immune modulators. *Clin. Exp. Immunol.*, 107 (Suppl. 1): 25–30.
- [0225] Lieberman, J. M., and Greenberg, D. P. (1996) Hepatitis A and B Vakzines in children. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.*, 11: 333–363.
- [0226] Malik, A., et al. (1991) Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3300–3304.
- [0227] Mast, E. E., and Krawczynski, K. (1996) Hepatitis E: An overview. *Annu. Rev. Med.*, 47: 257–266.
- [0228] Mckenzie, A. W., and Stoughton, R. B. (1962) Method for comparing percutaneous absorption of corticosteroids. *Arch. Dermatol.*, 86: 608–610.
- [0229] Medzhitov, R., and Janeway, C. A. (1997) Innate immunity: Impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 4–9.
- [0230] Mekalanos, J. J., et al. (1979) Enzymatic activity of cholera toxin II. Relationships to proteolytic processing, disulphide bond reduction, and subunit composition. *J. Biol. Chem.*, 254: 5855–5861.
- [0231] Migliorini, P., et al. (1993) Malaria Vakzine: Immunization of mice with a synthetic T cell helper epitope alone leads to protective immunity. *Eur. J. Immunol.*, 23: 582–585.
- [0232] Morein, B., and Simons, K. (1985) Subunit Vakzines against enveloped viruses: Virosomes, micelles and other protein complexes. *Vakzine*, 3: 83–93.
- [0233] Munoz, E., et al. (1990) Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in receptor-mediated activation: Role of cAMP in T cell proliferation. *J. Exp. Med.*, 172: 95–103.
- [0234] Murray, E. J. (1991) Gene Transfer and Expression Protocols. Humana Press, Clifton, New Jersey.
- [0235] Nohria, A., and Rubin, R. N. (1994) Cytokines as potential Vakzine Adjuvant. *Biotherapy*, 7: 261–269.
- [0236] Paul, A., and Cevc, G. (1995) Noninvasive administration of protein antigens: Transdermal immunization with bovine serum albumin in transfersomes. *Vakzine Res.*, 3: 145–164.
- [0237] Paul, A., et al. (1995) Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *Eur. J. Immunol.*, 25: 3521–3524, 1995.
- [0238] Paul, W. E., and Seder, R. A. (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76: 241–251.
- [0239] Pessi, A., et al. (1991) Lack of H-2 restriction of the *Plasmodium falciparum* (NANP) sequence as multiple antigen peptide. *Eur. J. Immunol.*, 24: 2273–2276.
- [0240] Pierce, N. F. (1978) The role of antigen form and function in the primary and secondary intestinal immune responses to cholera toxin and toxoid in rats. *J. Exp. Med.*, 148: 195–206.
- [0241] Pierce, N. F., and Reynolds, H. Y. (1974) Immunity to experimental cholera. I. Protective effect of humoral IgG antitoxin demonstrated by passive immunization. *J. Immunol.*, 113: 1017–1023.
- [0242] Plotkin, S. A., and Mortimer Jr., E. A. (1994) Vakzines, 2nd Ed., W. B. Saunders, Philadelphia.
- [0243] Proksch, E., and Brasch, J. (1996) Integrity of the permeability barrier regulates epidermal Langerhans cell density. *Br. J. Dermatol.*, 134: 630–638.
- [0244] Proksch, E., and Brasch, J. (1997) Influence of epidermal permeability barrier disruption and Langerhans'cell density on allergic contact dermatitis. *Acta Derm. Venereol.*, 77: 102–104.
- [0245] Rappuoli, R., et al. (1995) Genetic detoxification of bacterial toxins: A new approach to Vakzine development. *Int. Archiv. Allergy Immunol.*, 108: 327–333.
- [0246] Rappuoli, R., et al. (1996) New Vakzines against bacterial toxins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 397: 55–60.
- [0247] Ribi, N. O., et al. (1988) Three-dimensional structure of cholera toxin penetrating a lipid membrane. *Science*, 239: 1272–1276.
- [0248] Richards, R. L., et al. (1995) A compendium of Vakzine Adjuvant and excipients. In: *Vakzine Design* (Eds., Powell, M. F., and Newman, M. J.), Plenum, New York.
- [0249] Roberts, M. S., and Walker, M. (1993) Water, the most natural penetration enhancer. In: *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement* (Eds., Walters, K. A., and Hadgraft, J.), Marcel Dekker, New York.
- [0250] Saloga, J., et al. (1996) Superantigens. *Exp. Dermatol.*, 5: 65–71.
- [0251] Saukkonen, K., et al. (1992) Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 118–122.
- [0252] Schneerson, R. E., et al. (1996) A toxoid Vakzine for pertussis as well as diphtheria? Lessons to be relearned. *Lancet* 348: 1289–1292.
- [0253] Scopes, R. K. (1993) Protein Purification, Springer-Verlag, New York.
- [0254] Seder, R. A., and Paul, W. E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells.

- Annu. Rev. Immunol., 12: 635–673.
- [0255] Shafara, A., et al. (1995) Hepatitis C. Ann. Intern. Med., 125: 658–668.
- [0256] Skeiky, Y. A. W., et al. (1995) A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th 1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. J. Exp. Med., 181: 1527–1537.
- [0257] Smedile, A., et al. (1994) Advances in hepatitis D virus biology and disease. Prog. Liver Dis., 12: 157–175.
- [0258] Smucny, J. J., et al. (1995) Murine immunoglobulin G subclass responses following immunization with live dengue virus or a recombinant dengue envelope protein. Am. J. Trop. Med. Hyg., 53: 432–437.
- [0259] Sniderman, D. P. (1995) The mucosal Adjuvant activities of ADP-ribosylating bacterial enterotoxins. Crit. Rev. Immunol., 15: 317–348.
- [0260] Spangler, B. D. (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol. Rev., 56: 622–647.
- [0261] Stacey, K. J., et al. (1996) Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. J. Immunol., 157: 2116–2122.
- [0262] Stingl, G., et al. (1989) The immune functions of epidermal cells. Immunol. Ser., 46: 3–42.
- [0263] Streilein, J. W., and Grammer, S. F. (1989) In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. J. Immunol., 143: 3925–3933.
- [0264] Summers, M. D., and Smith, G. E. (1987) A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedure. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, No. 1555.
- [0265] Tam, J. P. (1988) Synthetic peptide Vakzine design: Synthesis and properties of a highdensity multiple antigenic peptide system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5409–5413.
- [0266] Tang, D. C., et al. (1997) Vakzination onto bare skin. Nature, 388: 729–730.
- [0267] Tew, J. G., et al. (1997) Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. Immunol. Rev., 156: 39–52.
- [0268] Trach, D. D., et al. (1997) Field trial of a locally produced, killed, oral cholera Vakzine in Vietnam. Lancet, 349: 231–235.
- [0269] Udey, M. C. (1997) Cadherins and Langerhans cell immunobiology. Clin. Exp. Immunol., 107 (Suppl. 1): 6–8. van Heyningen, W. E., and Seal, J. R. (1983) Cholera: The American Scientific Experience, 1947–1980, Westview Press, Boulder, Colorado.
- [0270] Vandenbark, A. A., et al. (1996) Treatment of multiple sclerosis with T-cell receptor peptides: Results of a double-blind pilot trial. Nature Medicine, 2: 1109–1115.
- [0271] Vreden, S. G. S., et al. (1991) Phase I clinical trial of a recombinant malaria Vakzine consisting of the circumsporozoite repeat region of *Plasmodium falciparum* coupled to hepatitis B surface antigen, Am. J. Trop. Med. Hyg., 45: 533–538.
- [0272] Wang, R., et al. (1995) Induction of protective polyclonal antibodies by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein multiple antigen peptide Vakzine. J. Immunol., 154: 2784–2793.
- [0273] White, K., et al. (1993) Induction of cytolytic and antibody responses using *Plasmodium falciparum* repeatless circumsporozoite protein encapsulated in liposomes. Vakzine, 11: 1341–1346.
- [0274] Wiesmueller, K.-H., et al. (1991) The antibody response in BALB/c mice to the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite repetitive epitope covalently coupled to synthetic lipopeptide adjuvant. Immunology, 72: 109–113.
- [0275] Wisdom, G. B. (1994) Peptide Antigens, IRL Press, Oxford.
- [0276] Zhang, T., et al. (1995) Oral immunization with the dodecapeptide repeat of the serinerich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the cholera toxin B subunit induces a mucosal and systemic anti-SREHP antibody response. Infect. Immun., 63: 1349–1355.

Patentansprüche

1. Verwendung von mindestens einem Antigen; mindestens einem ADP-ribosylierenden Exotoxin, dessen bindender B-Untereinheit oder Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins als Adjuvant; und eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers zur Herstellung einer Zusammensetzung für die transkutane Immunisierung durch Induzierung einer antigenspezifischen Immunantwort in einem Subjekt, wobei die Zusammensetzung in einer therapeutisch wirksamen Menge auf eine vorbehandelte Fläche der Haut des Subjekts, die nicht perforiert ist, aufgebracht wird und die Vorbehandlung mindestens das Stratum Corneum der Haut angreift.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Vorbehandlung die Penetration der Haut durch die Formulierung verstärkt.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Träger ein Verband ist.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei der Verband aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem okklusiven Verband, einem nicht-okklusiven Verband, einem Hydrogelverband und einem Reservoirverband besteht.
5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Vorbehandlung das Tupfen der vorbehandelten Fläche mit einem Tupfer umfasst.
6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Vorbehandlung das Aufbringen eines Mittels umfasst, das die Penetration der Haut durch die Zusammensetzung verstärkt.
7. Verwendung nach Anspruch 1, die darüber hinaus die Hydratation der vorbehandelten Fläche umfasst.
8. Verwendung nach Anspruch 5, wobei der Tupfer Aceton oder eine Zusammensetzung enthält, die Aceton enthält.
9. Verwendung nach Anspruch 5, wobei der Tupfer einen Alkohol oder eine Zusammensetzung enthält, die Alkohol enthält.
10. Verwendung nach Anspruch 5, wobei der Tupfer ein Detergenz oder eine Detergenzlösung enthält.
11. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Vorbehandlung das Aufbringen einer depilatorischen Zusammensetzung umfasst, wobei die Zusammensetzung auf der vorbehandelten Fläche für einen Zeitraum von 0,1–30 Minuten verbleibt.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der Zeitraum 4–20 Minuten ist.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei der Zeitraum 12 Minuten ist.
14. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Vorbehandlung das Aufbringen einer keratinolytischen Zusammensetzung umfasst, wobei die Zusammensetzung auf der vorbehandelten Fläche für einen Zeitraum von 0,1–30 Minuten verbleibt.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die keratinolytische Formulierung Salicylat ist.
16. Verwendung nach Anspruch 14, wobei der Zeitraum 4–20 Minuten ist.
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der Zeitraum 10 Minuten ist.
18. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Vorbehandlung das Angreifen der Oberflächenschicht der vorbehandelten Fläche mit einer angreifenden Vorrichtung umfasst.
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die angreifende Vorrichtung aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einer Nagelfeile, einem abrasiven Pad, einer gezackten Tuberkulintestvorrichtung, einem gasangetriebenen Schussgerät, einer Genkanone, einer Treibmittelvorrichtung, einer Mikronadelvorrichtung und einem Klebeband besteht.
20. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die antigenspezifische Immunantwort zur Proliferation von Lymphknotenzellen führt.
21. Verwendung nach Anspruch 1, die darüber hinaus das Aufbringen einer separaten Antigenformulierung auf das Subjekt umfasst.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die separate Antigenzusammensetzung zu einem Zeitpunkt nach dem Aufbringen der Zusammensetzung auf die vorbehandelte Fläche aufgebracht wird, wobei die separate Antigenzusammensetzung in dem Subjekt eine weitere Immunreaktion hervorruft.
23. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die separate Antigenzusammensetzung zu einem Zeitpunkt vor dem Aufbringen der Zusammensetzung auf die vorbehandelte Fläche aufgebracht wird, wobei die separate Antigenformulierung eine weitere Immunantwort in dem Subjekt hervorruft.

24. Verwendung nach Anspruch 21, wobei ein einzelnes Moleköl der Formulierung sowohl Antigen als auch Adjuvanzeigenschaften aufweist.
25. Verwendung nach Anspruch 21, wobei das Aufbringen der adjuvanzhaltigen Zusammensetzung und das Aufbringen der separaten Antigenzusammensetzung gleichzeitig erfolgen.
26. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Antigen zumindest teilweise gereinigt wird und ein proteinartiges Antigen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 Dalton darstellt.
27. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die separate Antigenzusammensetzung durch intramuskuläre Injektion angewendet wird, oder auf einem Weg, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus oraler, nasaler, buckaler, rektaler, vaginaler und intradermaler Verabreichung besteht.
28. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die separate Antigenzusammensetzung parenteral verabreicht wird.
29. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Antigen auf der Zelloberfläche einer Langerhanszelle einem Lymphozyten präsentiert wird, wodurch eine Immunantwort in dem Subjekt hervorgerufen wird.
30. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Exposition gegenüber dem Adjuvanz die Migration der Langerhanszelle in einen Lymphknoten hervorruft.
31. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Exposition gegenüber dem Adjuvanz der Langerhanszelle signalisiert, zu einer dendritischen Zelle zu reifen.
32. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Antigen zumindest teilweise gereinigt wird und von einer Quelle abgeleitet ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Pathogen, einer Tumorzelle und einer normalen Zelle besteht.
33. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Antigen zumindest teilweise gereinigt und von einem Pathogen abgeleitet wird, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten besteht.
34. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Antigen zumindest teilweise gereinigt und aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Tumorantigen, einem Autoantigen, einem Allergen und einem Mittel zur biologischen Kampfführung besteht.
35. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Antigen zumindest teilweise gereinigt und aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Kohlenhydrat, Glykolipid, Glykoprotein, Lipid, Lipoprotein, Phospholipid und Polypeptid besteht.
36. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung darüber hinaus eine ganze Zelle umfasst, einen lebendigen oder einem abgeschwächt lebendigen Virus oder ein Virosom und das Antigen von der ganzen Zelle, dem lebendigen oder geschwächt lebendigen Virus oder dem Virosom exprimiert wird.
37. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Antigen multivalent ist.
38. Verwendung nach Anspruch 30, die darüber hinaus die Aktivierung der Langerhanszelle zur Steigerung der Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II umfasst.
39. Verwendung nach Anspruch 30, wobei das Adjuvanz die Langerhanszellen aktiviert.
40. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Adjuvanz die Antigenpräsentation gegenüber einem Lymphozyten verstärkt.
41. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Choleratoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder ein Toxoid des Choleratoxins ist.
42. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Diphtherietoxin, dessen bindende B-Untereinheit

oder ein Toxoid des Diphtherietoxins ist.

43. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins das *E. coli* hitzelabile Enterotoxin (I. T), dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von LT ist.

44. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Pertussistoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid des Pertussistoxins ist.

45. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins *Pseudomonas* Exotoxin A ist, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von *Pseudomonas* Exotoxin A.

46. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eine ADP-ribosylierenden Exotoxins in der Zusammensetzung als Nukleinsäure bereitgestellt wird, einschließlich einer Sequenz, die ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder ein Toxoid des ADP-ribosylierenden Exotoxins codiert.

47. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Antigen in der Formulierung als Nukleinsäure bereitgestellt wird, einschließlich einer Sequenz, die das Antigen codiert.

48. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Nukleinsäure nicht-integrierend und nicht-infektiös ist.

49. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Nukleinsäure darüber hinaus eine regulatorische Region einschließt, die in operabler Weise mit der das Antigen codierenden Sequenz verbunden ist.

50. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung eine Creme, eine Emulsion, ein Gel, eine Lotion, eine Salbe, eine Paste, eine Lösung oder eine Suspension ist.

51. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung auf intakte Haut aufgebracht wird, mehr als ein drainierendes Lymphknotenfeld abdeckend.

52. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Immunisierung zur Behandlung einer Krankheit des Subjekts dient.

53. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Immunisierung zur Verhinderung einer Krankheit des Subjekts dient.

54. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Immunisierung zur Behandlung einer Krankheit des Subjekts dient, die durch die Exposition gegenüber dem Antigen verursacht ist.

55. Verwendung nach Anspruch 1, wobei ein einzelnes Molekül der Zusammensetzung sowohl Antigen- als auch Adjuvanzeigenschaften aufweist.

56. Artikel zur transkutanen Immunisierung, umfassend (i) eine Zusammensetzung, die mindestens ein Antigen und mindestens ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder ein Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins als Adjuvanz einschließt; (ii) ein Verband, der zur Adhäsion geeignet ist; und (iii) einen Verstärker der Hautpenetration; wobei der Artikel so angepasst ist, dass die Zusammensetzung unter dem Verband auf die Haut des Subjekts aufgebracht wird und der Verstärker der Hautpenetration so angepasst ist, dass er zumindest das Stratum Corneum der Haut ohne Perforation angreift.

57. Artikel nach Anspruch 56, wobei der Verstärker der Hautpenetration aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Alkohol, Aceton, einem Detergenz, einer depilatorischen Substanz und einer keratinolytischen Substanz besteht.

58. Artikel nach Anspruch 57, wobei der Verstärker der Hautpenetration Alkohol oder Aceton in Kombination mit einem Tupfer ist.

59. Artikel nach Anspruch 56, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Choleratoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von Choleratoxin ist.

60. Artikel nach Anspruch 56, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Diphtherietoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder ein Toxoid von Diphtherietoxin ist.

61. Artikel nach Anspruch 56, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins das hitzelabile *E. coli* Enterotoxin (LT), dessen bindende B-Untereinheit oder ein Toxoid von LT ist.

62. Artikel nach Anspruch 56, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Pertussistoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid des Pertussistoxins ist.

63. Artikel nach Anspruch 56, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins *Pseudomonas* Exotoxin A, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von *Pseudomonas* Exotoxin A ist.

64. Artikel nach Anspruch 56, wobei ein einzelnes Molekül der Zusammensetzung sowohl Antigen- als auch Adjuvanzeigenschaften aufweist.

65. Artikel nach mindestens einem der Ansprüche 56 bis 64, wobei das Antigen zumindest teilweise gereinigt ist und ein proteinartiges Antigen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 Dalton darstellt.

66. Artikel nach mindestens einem der Ansprüche 56 bis 64, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und aus einer Quelle abgeleitet wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Pathogen, einer Tumorzelle und einer normalen Zelle besteht.

67. Artikel gemäß mindestens einem der Ansprüche 56 bis 64, wobei das Antigen zumindest teilweise gereinigt ist und von einem Pathogen abgeleitet ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten besteht.

68. Artikel nach mindestens einem der Ansprüche 56 bis 64, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Tumorantigen, einem Autoantigen, einem Allergen und einem Mittel zur biologischen Kampfführung ausgewählt ist.

69. Artikel nach mindestens einem der Ansprüche 56 bis 64, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Kohlenhydrat, einem Glykolipid, einem Glycoprotein, einem Lipid, einem Lipoprotein, einem Phospholipid und einem Polypeptid besteht.

70. Artikel nach mindestens einem der Ansprüche 56 bis 64, wobei das Antigen in der Zusammensetzung als Nukleinsäure bereitgestellt wird, einschließlich einer das Antigen codierenden Sequenz.

71. Vorrichtung zum Überwinden einer Barriere mit einer Vielzahl von Zinken für die transkutane Immunisierung, wobei die Zinken mit einer Zusammensetzung beschichtet sind, die mindestens ein Antigen und mindestens ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder Toxoid des ADP-ribosylierenden Exotoxins enthält; und wobei die Zinken so ausgebildet sind, dass sie zumindest das Stratum Corneum der Haut des Subjekts angreifen, ohne die Haut des Subjekts zu perforieren.

72. Vorrichtung nach Anspruch 71, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Choleratoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von Choleratoxin ist.

73. Vorrichtung nach Anspruch 71, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Diphtherietoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder ein Toxoid von Diphtherietoxin ist.

74. Vorrichtung nach Anspruch 71, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Choleratoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von Choleratoxin ist.

heit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins *E. coli* hitrelabiles Enterotoxin (LT), dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von LT ist.

75. Vorrichtung nach Anspruch 71, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Pertussistoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von Pertussistoxin ist.

76. Vorrichtung nach Anspruch 71, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins *Pseudomonas* Exotoxin A, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von *Pseudomonas* Exotoxin A ist.

77. Vorrichtung nach Anspruch 71, wobei ein einzelnes Molekül der Zusammensetzung sowohl Antigen- als auch Adjuvanzeigenschaften aufweist.

78. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 71 bis 77, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und ein proteinartiges Antigen mit einem Molekulargewicht mit mehr als 1000 Dalton darstellt.

79. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 71 bis 77, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und aus einer Quelle abgeleitet ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Pathogen, einer Tumorzelle und einer normalen Zelle besteht.

80. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 71 bis 77, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und von einem Pathogen abgeleitet ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten besteht.

81. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 71 bis 77, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Tumortypen, einem Autoantigen, einem Allergen und einem Mittel zur biologischen Kampfführung besteht.

82. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 71 bis 77, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Kohlenhydrat, Glykolipid, Glykoprotein, Lipid, Lipoprotein, Phospholipid und Polypeptid besteht.

83. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 71 bis 77, wobei das Antigen in der Formulierung als Nukleinsäure bereitgestellt wird, einschließlich einer das Antigen codierenden Sequenz.

84. Treibmittelvorrichtung für die transkutane Immunisierung, wie ein Abschussgerät, wobei die Vorrichtung eine Zusammensetzung umfasst, die mindestens ein Antigen und mindestens ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins als Adjuvant enthält; und wobei die Vorrichtung so ausgelegt ist, dass die Zusammensetzung durch Penetration in die Epidermis oder superfizielles Dermis der Haut eines Subjekts aber nicht unter Penetration der Dermis verabreicht wird.

85. Vorrichtung nach Anspruch 84, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Choleratoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von Choleratoxin ist.

86. Vorrichtung nach Anspruch 84, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Diphtherietoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von Diphtherietoxin ist.

87. Vorrichtung nach Anspruch 84, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins das hitzelabile *E. coli* Enterotoxin (LT), dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von (LT) ist.

88. Vorrichtung nach Anspruch 84, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Pertussistoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder das Toxoid von Pertussistoxin ist.

89. Vorrichtung nach Anspruch 84, wobei das ADP-ribosylierende Exotoxin, dessen bindende B-Unterein-

heit oder das Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins Pseudomonas Exotoxin A, dessen bindende B-Untereinheit oder Toxoid von Pseudomonas Exotoxin A ist.

90. Vorrichtung nach Anspruch 84, wobei ein einzelnes Molekül der Zusammensetzung sowohl Antigen- als auch Adjuvanzeigenschaften aufweist.

91. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 84 bis 90, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und als proteinartiges Antigen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 Dalton vorliegt.

92. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 84 bis 90, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und aus einer Quelle abgeleitet ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Pathogen, einer Tumorzelle und einer normalen Zelle besteht.

93. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 84 bis 90, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und von einem Pathogen abgeleitet ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten besteht.

94. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 84 bis 90, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Tumortypen, einem Autoantigen, einem Allergen und einem Mittel zur biologischen Kampfführung besteht.

95. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 84 bis 90, wobei das Antigen zumindest teilweise aufgereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Kohlenhydrat, Glykolipid, Glykoprotein, Lipid, Lipoprotein, Phospholipid und Polypeptid besteht.

96. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 84 bis 90, wobei das Antigen in der Zusammensetzung als Nukleinsäure bereitgestellt wird, einschließlich einer Sequenz, die das Antigen codiert.

97. Kit für die transkutane Immunisierung, umfassend:
mindestens ein Antigen und mindestens ein ADP-ribosylierendes Exotoxin, dessen bindende B-Untereinheit oder Toxoid eines ADP-ribosylierenden Exotoxins als Adjuvanz in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger; und
mindestens einen Verstärker der Hautpenetration oder eine Vorrichtung zum Angreifen einer Barriere, wobei der Verstärker der Hautpenetration oder die Vorrichtung zum Angreifen einer Barriere so ausgelegt sind, dass sie zumindest das Stratum Corneum der Haut des Subjekts angreifen, ohne die Haut des Subjekts zu perforieren, um eine Immunantwort zu induzieren, die für das Antigen spezifisch ist.

98. Kit nach Anspruch 97, wobei der Verstärker der Hautpenetration aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Alkohol, Aceton, einem Detergent, einer depilatorischen Substanz und einer keratinolytischen Substanz besteht.

99. Kit nach Anspruch 97, wobei die angreifende Vorrichtung aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einer Nagelfeile, einem abrasiven Pad, einer gezackten Tuberkulintestvorrichtung, einer gasangetriebenen Schussvorrichtung, einer Genkanone, einer Treibmittelvorrichtung, einer Mikronadelvorrichtung und einem Klebeband besteht.

100. Kit nach Anspruch 97, wobei ein einzelnes Molekül sowohl Antigen- als auch Adjuvanzeigenschaften aufweist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

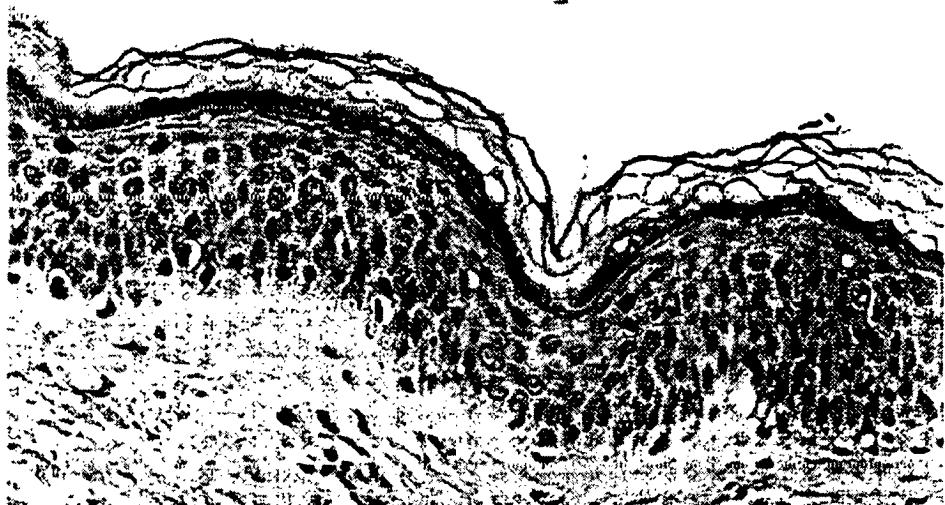


FIG. 1A



FIG. 1B

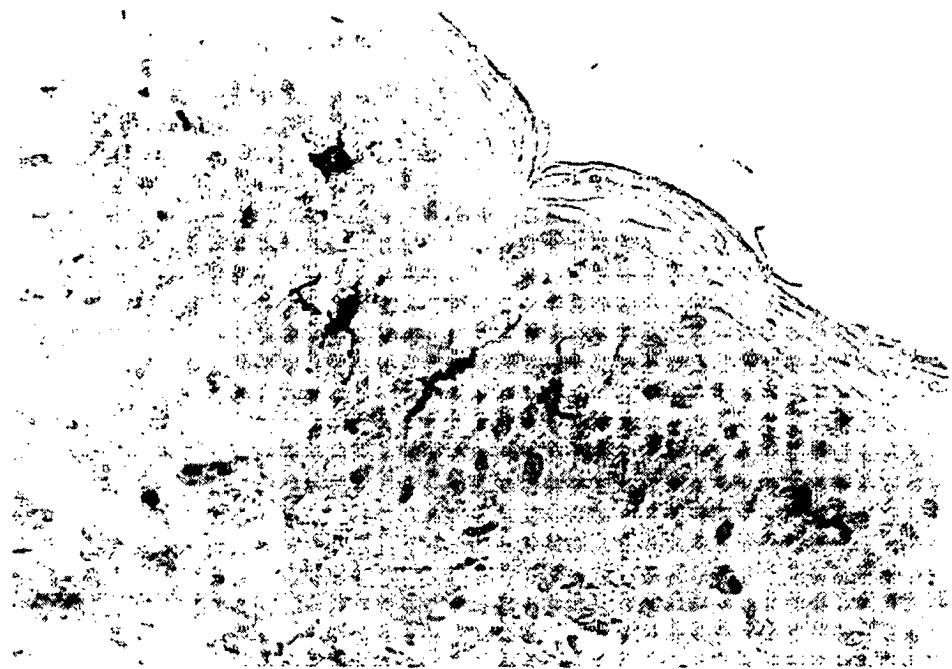


FIG. 1C

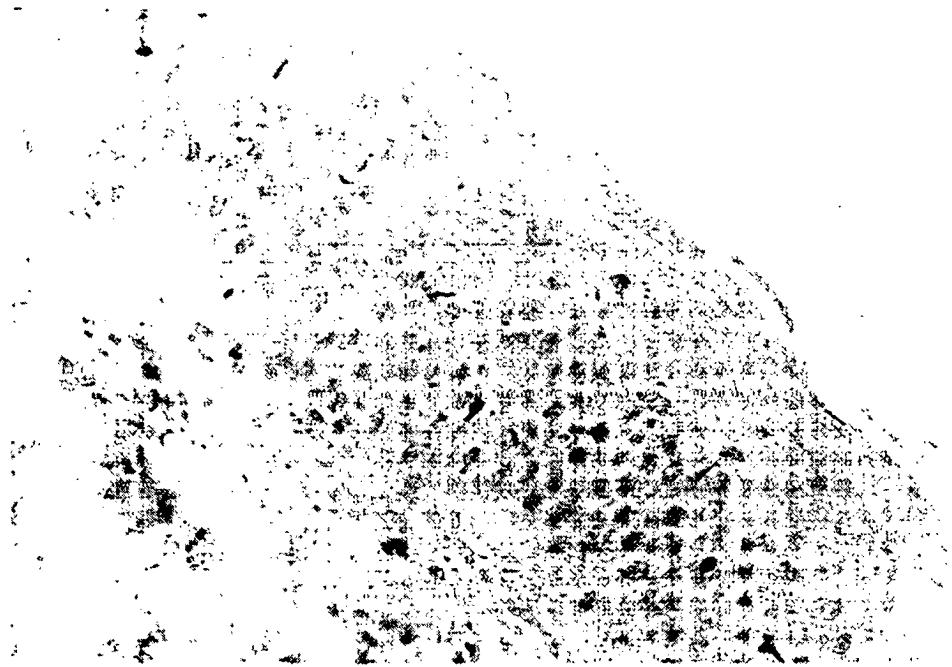


FIG. 1D

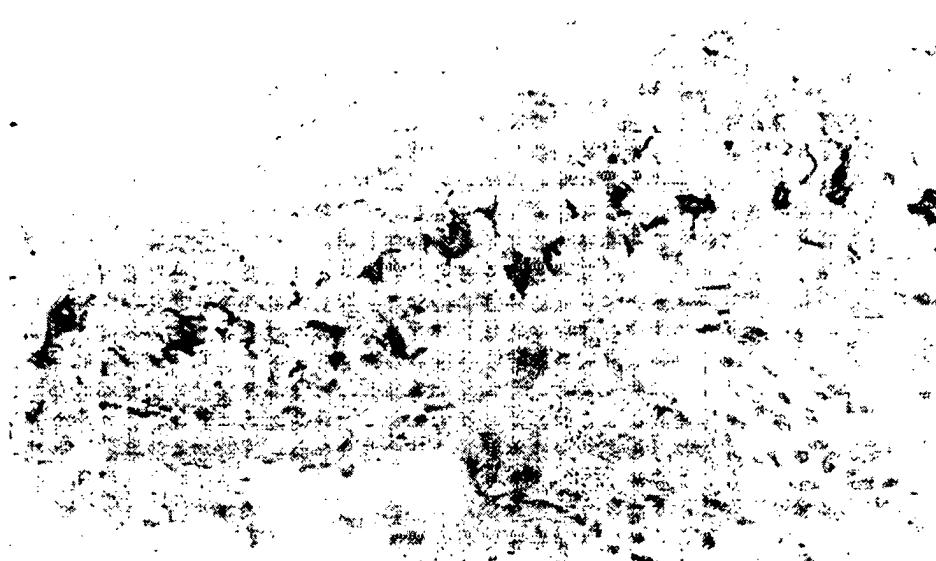


FIG. 1E

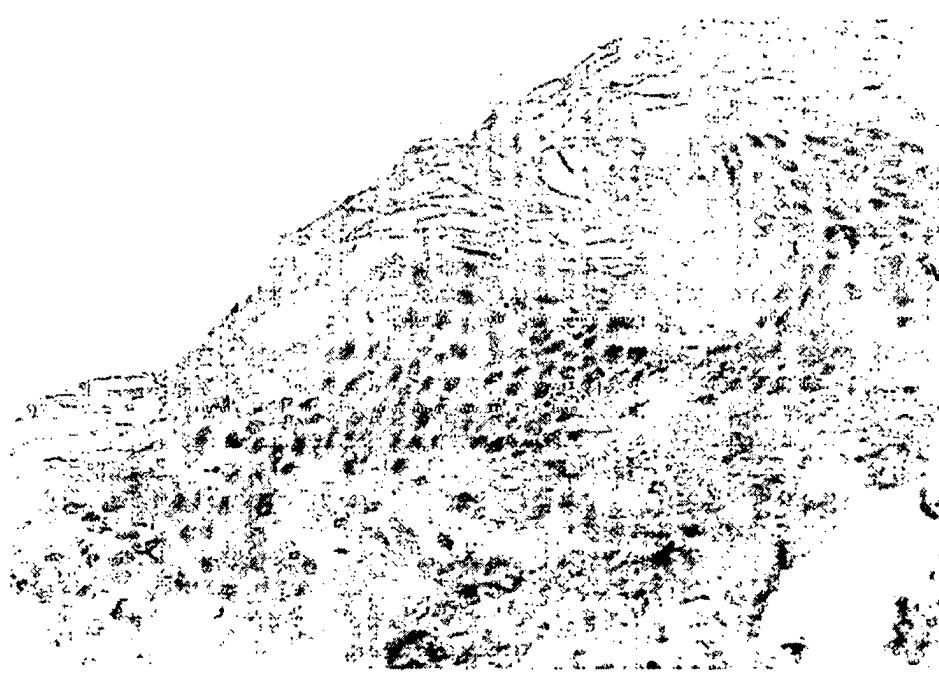


FIG. 1F



FIG. 2A



FIG. 2B

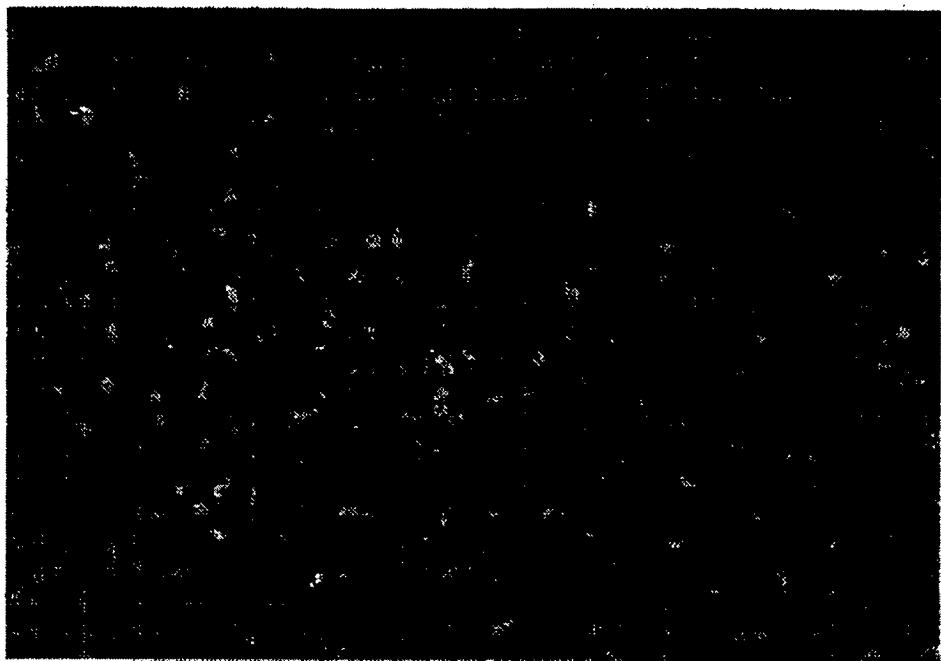


FIG. 2C



FIG. 2D