



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 36 355 T2 2008.02.21

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 356 821 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 36 355.1

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 007 948.7

(96) Europäischer Anmeldetag: 25.02.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 29.10.2003

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 20.06.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 21.02.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 39/39 (2006.01)**

*A61K 9/00 (2006.01)*

*C12N 15/11 (2006.01)*

*A61K 39/00 (2006.01)*

*A61K 38/16 (2006.01)*

*A61K 39/02 (2006.01)*

*A61K 39/106 (2006.01)*

(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 GbR, 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, Gregory M., Gaithersburg, MD 20878, US;  
Alving, Carl B., Bethesda, MD 20814, US**

(54) Bezeichnung: **Verwendung von Hautpenetrationsförderern und für die Zerstörung der oberen Hautschichten  
geeigneten Mitteln zur Erhöhung der transkutanen 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 die transkutane Immunisierung unter Verwendung eines ADP-ribosylierenden Exotoxins, oder anderer Adjuvantien 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, Adjuvans, 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 den 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 Adjuvans und Antigens, das spezifische Immuneffektoren freisetzt und einen therapeutischen Vorteil vermittelt, durch die einfache Anwendung von Adjuvans und Antigen auf der Haut scheint vor unserer Erfindung noch nicht gelehrt oder vorgeschlagen worden zu 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 injiziert 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, und eine ähnliche Rötung und Schwellung verursachen würde, 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 Kulturmédien. Die 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 und eine unerwünschte Reaktion hervorrufen würde, wenn es auf der Haut angewendet würde. 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, dass es sowohl als Antigen als auch als Adjuvans wirkt, wenn es 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 erfindungsgemäß auf die Haut aufgetragen wurde, als ein nicht toxisches, nicht reaktogenes Adjuvans, im Gegensatz zu den Erwartungen von Craig, während die Injektion von CT in die Haut eine 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 die 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]** Dieses unerwartete Fehlen von Reaktogenität ist sehr wichtig für die Verwendung von Vakzinen. Vakzine-Antigene und -Adjuvantien sind verwendbar, wenn die Immunisierung eine schützende Immunantwort ohne signifikante, unerwünschte Reaktionen hervorruft. Historisch gesehen wurde die Reaktogenität von Vakzinen, wie zum Beispiel eine Schwellung, Schmerzempfindlichkeit und Schmerzen an der Injektionsstelle in ei-

nigen 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-Adjuvantien und Antigenkandidaten. Die Forschungsbemühungen konzentrieren sich auf die Herstellung von Vakzine-Adjuvantien, die stimulatorisch sind, aber keine unerwünschten Reaktionen hervorrufen. Gesamtzell-Pertussis-Vakzinen induzieren systemische und lokale Nebenwirkungen, und als Ergebnis werden diese wirksamen Vakzine und bewährten 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 Sägerwirt kodiert. Die hier beschriebene Erfindung lehrt die Verwendung eines Adjuvans und Antigens, 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, Reinigung und Synthese von Peptiden und ihren kurzen Halbwertszeiten in vivo, die sich aus dem Abbau durch Proteasen, die im Targetgewebe vorhanden sind, ergeben. Dies führt weg von dem Zusatz eines Adjuvans, 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 einer lokalen Entzündung oder Reizung ab, um die Permeabilität von Zellmembranen zu erhöhen, um die Aufnahme des Antigens, Plasmids oder der RNA zu verstärken. Tatsächlich ist das herausragende Merkmal in Bezug auf die transkutane Immunisierung das Fehlen einer lokalen Entzündung.

**[0008]** Im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung lehrt Patent Nr. 5,824,313 die Anwendung von extrem kleinen (weniger als 500 Dalton) Lymphoidorgan-modifizierenden Agentien wie 1,25-Dihydroxy-16-en Vitamin D<sub>3</sub> und Calcipotrien oder Dehydroepiandrosteron (DHEA), DHEA-Artverwandte und DHEA-Derivative mit der intramuskulären Injektion von einem Antigen, um Antikörperantworten zu bewirken.

**[0009]** Die 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 eine Immunantwort auf das Antigen. Fisher's Kontaktdermatitis erklärt, dass Moleküle von mehr als 500 Dalton 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 Dalton 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 Dalton aufweist) als ein Antigen oder Adjuvan 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.

**[0011]** 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/US 97/21324 (eingereicht am 14. November 1997, WO 98/20734) gezeigt, dass die Verwendung eines ADP-ribosylierenden Exotoxins wie Choleratoxin als ein Antigen eine starke Antikörperantwort auslösen kann, die hoch reproduzierbar ist. Wenn ein ADP-ribosylierendes Exotoxin wie Choleratoxin als Immun-Adjuvan verwendet und in einer Salzlösung mit einem separaten Antigen (z.B. Diphtheriatoxin) auf die Haut aufgebracht wurde, konnte eine systemische und mukosale Antigen-spezifische Antikörperantwort ausgelöst werden. In der vorliegenden Anmeldung offenbaren wir, dass die transkutane Immunisierung unter Verwendung eines Penetrationsförderers, eines für die Zerstörung der oberen Hautschichten geeigneten Mittels oder einer Kombinationen davon, die adjuvante Aktivität eines bakteriellen Exotoxins verbessern können.

**[0012]** Wir haben gezeigt, dass hitzelabiles Enterotoxin von *E. coli* (LT), *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA), Pertussistoxin (PT) und eine große Vielzahl von Antigenen, einschließlich abgetöteter Tollwut-Viren, Rekombinante wie HIV p55 gag, Polysaccharidkonjugate wie Hib, Ultraschallextrakte, zum Beispiel Pertaktin, wie Cholera-toxin (CT) in der Lage sind, die Haut zu durchdringen und eine Immunantwort auszulösen. Zusätzlich können CT, LT, ETA und PT und bakterielle DNA und Cytokine 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, die bevorzugten Antigen-präsentierenden Zellen für den Transfer von Antigen zum Immunsystem darstellt. Das Adjuvans kann auf die Antigen-präsentierende Zelle direkt oder durch Lymphozyten, die das Antigen erkennen, einwirken.

**[0013]** Wir schlagen vor, die Immunantwort auf das transkutane Adjuvans 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 die transkutane Immunisierung unter Verwendung von beispielsweise einem ADP-ribosylierenden Exotoxin als Adjuvans und von einem löslichen Proteinantigen, wie Diphtherietoxoid, muss eine Penetration des Stratum Corneum stattfinden. Penetrationsfördernde Techniken würden so ausgestaltet werden, dass sie die Bewegung von transkutanen Antigenen und Adjuvantien durch die Stratum Corneum-Schicht der Haut verstärken.

**[0014]** Des Weiteren schlagen wir vor, dass die transkutane Immunisierung unter Verwendung einer Aktivierung von mindestens einer Komponente der Antigen-, Adjuvans- oder Hautkomponenten die Immunantwort verstärken wird, gemessen an quantitativen und qualitativen Parametern. Das Antigen-Adjuvans der Formulierung kann durch Trypsinspaltung eines bakteriellen Exotoxins (z.B. Trypsin-gespaltenes LT, mit oder ohne Reduktion) aktiviert werden. Die 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 die Aktivierung der unterhalb liegenden Langerhans-Zellpopulation erhöht, oder durch ein Enzym oder eine Kombination von Enzymen (z.B. Enzymen mit Sialidase-Aktivität), was die Menge oder die Zugänglichkeit des Gangliosid-Rezeptors GM1 erhöht.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0015]** Es ist eine Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes System für die transkutane Immunisierung bereitzustellen, das eine Immunantwort (zum Beispiel einen humoralen und/oder zellulären Effektor) in einem Probanden induziert, wobei der Proband ein Mensch oder ein Tier ist. Dieses Transport-System liefert eine einfache Auftragung einer Formulierung auf die unversehrte Haut eines Organismus, wobei die Formulierung ein Antigen und ein Adjuvans umfasst, um eine spezifische Immunantwort gegen das Antigen zu induzieren. Obwohl die Ergänzung des vorstehend erwähnten Verfahrens mit einem Penetrationsförderer oder das Durchbrechen einer Barriere nicht erforderlich ist, um eine Immunantwort durch dieses einfache Transportsystem zu induzieren, können sie die Immunisierung und/oder Impfung verbessern.

**[0016]** Insbesondere kann das Adjuvans 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 das Antigen den Lymphozyten präsentieren (z.B. B- und/oder T-Zellen), wodurch sie eine antigenspezifische Immunantwort induzieren.

**[0017]** Zusätzlich kann die Aktivierung des Antigens, Adjuvans, der Haut oder einer Kombination davon erreicht werden, um den Immunisierungsprozess zu unterstützen.

**[0018]** Zusätzlich zum Auslösen von Immunreaktionen, die zur Bildung von antigenspezifischen B-Lymphozyten und/oder T-Lymphozyten einschließlich der zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) führen, ist es eine weitere Aufgabe der Erfindung, durch Verwendung des transkutanen Immunisierungssystems die Komponenten des Immunsystems positiv und/oder negativ zu regulieren, um antigenspezifische Helfer (Th1 und/oder Th2) oder T-Zelluntergruppen mit einer Hypersensibilität vom verzögerten Typ (DTH) zu beeinflussen. Dies kann durch das unterschiedliche Verhalten von CT und LT veranschaulicht werden, das unterschiedliche T-Helfer-

rantworten oder unterschiedliche Grade von Schutz in Formen der Exposition in vivo bei Verwendung von transkutaner Immunisierung zur Folge haben kann.

#### BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0019]** Die 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.

**[0020]** Die Abb. 2a-d sind Photographien, die normale Langerhanszellen (A, B, 200-fach und 400-fach) und die Aktivierung von Langerhanszellen durch Choleratoxin in Maushaut (C, D, 200-fach und 400-fach) zeigen.

#### BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0021]** 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 Adjuvans wie CT und DT enthält, nach Förderung der Penetration der Haut auf die intakte Haut eines Organismus aufgebracht, das Antigen wird den Immunzellen präsentiert, und eine antigenspezifische Immunantwort wird induziert, ohne die Haut zu perforieren. Die Formulierung kann zusätzliche Antigene oder 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 ein Teil der Immunantwort sein.

**[0022]** 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 eine 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) bereitstellen. Die Erfindung kann therapeutisch verwendet werden, um vorhandene Erkrankungen zu behandeln, und sie kann zum Schutz verwendet werden, um eine Erkrankung zu verhindern, oder um die Schwere und/oder die Dauer der Erkrankung zu verringern.

**[0023]** In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird eine Auflage zur Verwendung in den obigen Verfahren bereitgestellt. Die Auflage kann einen Verband sowie wirksame Mengen von Antigen oder Nukleinsäuren und Adjuvans umfassen. 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.

**[0024]** Ferner wird in einer weiteren Ausführungsform der Erfindung die Formulierung auf einer intakten Haut angewendet, die mehr als ein Gebiet überdeckt, das von einem Lymphknoten drainiert wird, unter Verwendung von entweder einzelnen oder mehreren Applikationen oder in einer separaten Auflage für Adjuvans 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 haben, so dass sie eine Immunantwort induzieren, die spezifisch für die unterschiedlichen Antigene ist.

**[0025]** Die Formulierung kann auf der Haut angewendet werden, um die Immunantwort zusammen über andere Wege der Immunisierung aufzufrischen oder zu starten. Daher können dem Starten mit entweder einer einzelnen oder mehreren Anwendungen mit transkutaner Immunisierung orale, nasale oder parenterale Techniken zum Auffrischen der Immunisierung mit den gleichen oder veränderten Antigenen folgen. Die Formulie-

rung 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 induzieren, die spezifisch für die unterschiedlichen Antigene ist.

**[0026]** Zusätzlich zum Antigen und dem aktivierten Adjuvans 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. Glyzerin) umfassen.

**[0027]** 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 Molekulargewicht des Antigens kann größer als 500 Dalton sein, vorzugsweise größer als 800 Dalton, und weiter bevorzugt größer als 1000 Dalton.

**[0028]** 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, eines ultraschallbehandelten oder lysierten ganzen Bakteriums, eines Parasiten oder eines mit Detergenz behandelten Virus oder einer Fraktion davon.

**[0029]** Das Einbeziehen eines Adjuvans kann die Potenzierung oder Modulation der Immunantwort ermöglichen. Darüber hinaus kann die Auswahl eines geeigneten Antigens oder Adjuvans die bevorzugte Induzierung einer humoralen oder zellulären Immun- oder Mukosaantwort, von spezifischen Antikörperisotypen (z.B. IgM, IgD, IgA1, IgA2, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, und/oder IgG4) und/oder von spezifischen Untergruppen von T-Zellen (z.B. CTL, Th1, Th2 und/oder  $T_{DTH}$ ) ermöglichen. Wahlweise können Antigen oder Adjuvans in der Formulierung bereitgestellt werden mittels einer Nukleinsäure (z.B. DNA, RNA, cDNA, cRNA), die das Antigen oder Adjuvans kodiert, wahlweise mit einem Antigen oder Adjuvans, das zu der Nukleinsäure hinzugefügt wurde. Diese Technik wird genetische Immunisierung genannt.

**[0030]** 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 von einem T-Zellrezeptor erkannt werden. Ein Molekül kann sowohl ein Antigen als auch ein Adjuvans (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.

**[0031]** Der Begriff "Adjuvans", wie in der Erfindung verwendet, soll eine Substanz beschreiben, die der Formulierung hinzugefügt wird, um die Induktion einer Immunantwort gegen das Antigen zu fördern.

**[0032]** 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, Desensibilisierung, Immunsuppression, Modulation von Autoimmunerkrankungen, Potenzierung von Krebsimmunüberwachung oder therapeutische Vakzinierung gegen eine etablierte Infektionserkrankung.

**[0033]** Unter dem Begriff „Epidermis“ verstehen wir die Zellen der Haut von der Basalschicht aus Keratinozyten oder Basallamina bis zum und durch das Stratum Corneum.

**[0034]** Die Definition von „transdermal“ wird generell angesehen als: das Bereitstellen einer Medikation in einer Form für die Absorption durch die Haut in den Blutstrom (~ Wirkstofffreisetzung) (~ Nitroglyzerin) (~ Nikotinpflaster). <sup>2</sup>Frederick C. Mish et al., Hrsg., Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 10. Aufl. (Springfield, MA.: Merriam-Webster, Incorporated, 1997), 861.

**[0035]** 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 Abdomens und Thorax).

**[0036]** 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 einer 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 nicht-polare (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."

**[0037]** Während allgemein bekannt ist, dass die Hauthydratation die Hautpenetration verstärkt, sind die Mechanismen, durch die dies stattfindet, nicht vollständig geklärt, und somit war es vor der vorliegenden Erfindung nicht vorhersagbar und wurde es nicht erwartet, dass die Penetration von großen Molekülen (7750 Dalton) möglich ist.

**[0038]** 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. Die Hydrokolloidauflagen können auch dazu verwendet werden, die Hautpenetration zu verstärken. Die Absorption von Steroiden kann unter Verwendung eines undurchlässigen Plastikfilms 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 Adjuvans waren vor unserer Erfindung nicht als Penetration bekannt. Es wurde angenommen, dass die Haut sogar im hydratisierten Zustand auf kleine Moleküle begrenzt ist.

**[0039]** 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.

**[0040]** 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.

**[0041]** 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.

**[0042]** Die Hautpermeabilität und/oder Hauthydratation können erwartet werden durch Auswählen eines angemessenen Vehikels aus verschiedenen Klassen, wie Netzmittel (z.B. Glykole, Glyzerine), 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 undurchlás-

sige Verbände (z.B. Plastikfolie).

**[0043]** Andere Verfahren, die Proteine des Stratum Corneum angreifen, um die Penetration im Sinne 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, N,N-verteilte Aminoessigsäurealkylester, Decylmethylsulfoxid, Pyrrolidone, Pirotidekan (HPE-101), Benzylalkonium, Benzylalkoniumchlorid-Polymere, silikonbasierte Polymere, Fettsäuren, cyclische Harnstoffe, Terpene, 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.

**[0044]** Eine Vorrichtung, die zum Angreifen des Stratum Corneum verwendet werden kann (die in den USA durch Connaught Laborstories, 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 einem Adjuvans 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.

**[0045]** Andere Ansätze schließen den Angriff auf eine Barriere ein. Die Inhibierung der Cholesterolsynthese unter Verwendung von systemisch verabreichten HMG CoA-Reduktase-Inhibitoren und ähnlichen Wirkstoffen interferiert mit der Barrierefunktion und kann eine verstärkte Penetration der Formulierungskomponente ermöglichen.

**[0046]** 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. Das Gangliosid GM1 ist ein allgegenwärtiges Zellmembran-Glykolipid, das in allen Säugerzellen gefunden wird. Im gastrointestinalem 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 der transkutanen Immunisierung dar, über Mechanismen wie die Aktivierung von Langerhanszellen, wie oben beschrieben.

**[0047]** Ein mögliches Verfahren, um die Haut zur Verstärkung der Wirkung der transkutanen Immunisierung mit ADP-ribosylierenden Exotoxinen zu aktivieren, 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 dadurch spielen, 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 Gang-

lioside 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 adrenalalen Zellen mit Sialidase erhöht deren Reaktivität gegenüber Choleratoxin; die Vorbehandlung von roten Zellen von Tauben mit Sialidase erhöht in ihnen die Aktivierung der Adenylatcyclase durch Choleratoxin." 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).

**[0048]** 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 die transkutane Immunisierung dar. Zusätzlich kann Neuraminidase als ein epidermales Enzym wirken, das gleichzeitig die Penetration verstärkt.

**[0049]** Die Verwendung eines Penetrationsförderers kann in Verbindung mit der Aktivierung der Haut angewandt werden. Die Aktivierung der Haut für die transkutane Immunisierung kann auch nach Behandlungen wie dem Betupfen mit Aceton oder Alkohol 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 erhöht und eine Aktivierung der Hautkomponenten durch transkutane Immunisierung zur Folge hat durch die Abrissmethode, Natriumdodecylsulfat, und durch die Verwendung von Alkoholtupfern oder eines Enthaarungsmittels wie Kalziumhydroxid. Siehe Proksch und Brasch (1996, 1997) zur Verwendung von Penetrationsförderern und Barriereförderung in allergischer Kontaktdermatitis.

**[0050]** 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.

**[0051]** Die Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Formulierung sind im Stand der Technik gut bekannt, wobei das Antigen und das Adjuvans mit einem pharmazeutisch akzeptablen Trägervehikel kombiniert werden. 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 des Adjuvans, 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, Trägerstoffe, Bindemittel, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und Farbstoffe.

**[0052]** 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 das 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.

**[0053]** Die 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 die Wanderung zu den Lymphknoten, wo sie als APCs wirken, um das Antigen den Lymphozyten zu präsentieren, und dadurch eine wirksame Antikörper-Antwort zu induzieren. 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 einer nicht entzündeten 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.

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 bezüglich der Morphologie, des Oberflächen-Phänotyps und der Funktion. Im Gegensatz zu epidermalen Langerhanszellen sind lymphoide dendritische Zellen im Wesentlichen nicht phagozytisch und prozessierende Protein-Antigene ineffizient, sie exprimieren aber 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.“

**[0054]** Wir stellen uns vor, dass die Fähigkeiten zur wirksamen Antigen Präsentation der epidermalen Langerhanszellen für transkutan 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 dass die Langerhanszellen nachfolgend aktiviert werden, 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 andere Adjuvantien 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.

**[0055]** Das Spektrum der allgemein bekannten Hautimmunantworten wird durch Kontaktdermatitis und Atopie repräsentiert. Kontaktdermatitis, eine pathogene Manifestation der LC-Aktivierung, wird durch Langerhanszellen gesteuert, die das Antigen phagozytieren, zu den Lymphknoten wandern, das Antigen präsentieren und die 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).

**[0056]** Die transkutane Immunisierung mit Choleratoxin und verwandten bAREs stellt auf der anderen Seite eine neue Immunantwort ohne oberflächliche und mikroskopische, nach der Immunisierung auftretende Hauthauffälligkeiten (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 einer nicht-entzündeten 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 transkutären 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.

**[0057]** 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. Transkutanes Adjuvans 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.

**[0058]** 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, oder sogar zum Modulieren in negativer Hinsicht, von Langerhanszellen oder anderen Hautimmunzellen schließen z.B. die Verwendung von entzündungshemmenden, steroidalen oder nicht-steroidalen Agentien (NSAID), Cyclophosphamid und anderen Immunsuppressoren, Interleukin-10, TGF- $\beta$ , monoklonalen Antikörpern gegen Interleukin-1, ICE-Inhibitoren oder Verminderung durch Super-Antigene, wie die durch *Staphylococcus Enterotoxin-A* (SEA) induzierte Abreicherung der Langerhanszellen in der Epidermis, ein.

**[0059]** 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.

**[0060]** Wir haben gezeigt, dass die transkutane Immunisierung durch CT oder CTB die 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 durch die gleichzeitige Anwesenheit der A-Untereinheit stärker aktiviert wird.

**[0061]** Zusätzlich zur Aktivierung der Hautkomponente in dem Immunisierungsprozess der vorliegenden Erfindung kann das Antigen und/oder Adjuvans 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 von LT verbinden, was seine Adjuvans-Aktivität vermindert.

**[0062]** 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 Adjuvantien zu wirken.

**[0063]** 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 (Adenylatcyclase) auf der basolateralen Oberfläche der intestinalen Epithelzelle nicht erreichen. Dieser Unterschied in der Aktivierung des isolierten Materials führt zu Unterschie-

den in den Antwort-Schwellenwerten für LT und CT in biologischen Systemen. Beispielsweise induziert CT eine nachweisbare Netto-Flüssigkeitssekretion im Mäusedarm bei einer Dosis von 5 bis 10 µg. 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).

**[0064]** 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 Ernährungsfähigkeit 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.“

Sowohl die intakte A1-Untereinheit als auch das Holotoxin sind relativ inaktive ADP-Ribosyltransferasen verglichen mit dem A1-Polypeptid. Die katalytische Aktivität erfordert die Reduktion der Disulfidbindung (A1:Cys-187-A2:Cys-199), die A1 und A2 verbindet. Die Spaltung (Einkerbung) zwischen den 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:Proteinoxidoreduclease. 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 der Insertion oder Translokation, erforderlich ist.“

**[0065]** LTh steht für LT-Holoenzym. Daher erwarten wir, dass, falls trypsinbehandeltes LT für die transkutane Immunisierung verwendet werden würde, ähnliche Mechanismen für die Spaltung der Disulfidbindungen auftreten. Dies kann für die 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 ist (siehe Dickinson und Clements, 1995).

**[0066]** Wir schlagen vor, die Komponenten der Formulierung wie LT vor der Anwendung auf der Haut unter Verwendung von Trypsin oder ähnlichen Verbindungen zu aktivieren, um die Adjuvansaktivität und die Immunogenität von LT zu verstärken. Man kann auch erwarten, dass die Aktivierung von LT die Immunantwort auf LT als ein Antigen verstärkt. Das aktivierte Adjuvans für die transkutane Immunisierung ist vorzugsweise ein ADP-ribosylierendes Exotoxin. Wahlweise können Hydratation oder undurchlässige Verbände im transkutanen Transfersystem, zusätzlich zur Aktivierung des Adjuvans, verwendet werden.

**[0067]** Zusätzlich weist LT eine ungewöhnliche Affinität zu Kohlenhydrat-enthaltenden Matrices auf. Insbesondere bindet LT an eine Reihe von biologischen Molekülen, die Galaktose enthalten, einschließlich Glykoproteinen und Lipopolysacchariden. Diese lektinähnliche Bindungseigenschaft von LT bewirkt eine breitere Rezeptorverteilung auf Sägerzellen für LT als für CT, das nur an GM1 bindet. Die zwei Moleküle besitzen auch viele immunologische Unterschiede, wie durch Immundiffusionsstudien gegen LT-assozierte *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-Adjuvans verwendet wird, induziert CT selektiv in einigen Fällen Th2-Typ-Zellen in den Peyerischen Drüsen und in der Milz, was sich in der Produktion von Interleukin 4 und Interleukin 5, aber nicht von 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 Adjuvans 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 dem Inhalieren von nativen Toxinen verbunden sind.

**[0068]** In einer ähnlichen Weise kann PT aktiviert werden, um seine Adjuvans- 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 Assoziation der S1-Untereinheit mit dem B-Oligomer spielen. Es ist vorstellbar, dass die Aktivierung durch Trypsinspaltung, Unterbrechung der Disulfidbindung oder beides die Adjuvans- und Antigenaktivitäten von PT im Zusammenhang mit der transkutanen Immunisierung verstärken. Die 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 abzzielen.

**[0069]** Die Aktivierung des Antigens oder Adjuvans könnte auf das Konzept der transkutanen Immunisierung unter Verwendung von DNA durch Herstellung eines Fusionsproteins, das Antigen- und Adjuvansdomänen 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 wird. Die Expression der ADP-ribosylierenden Exotoxinkomponente des Fusionsproteins wie CT oder LT könnte die Langerhanszelle aktivieren und bewirken, dass sie wandert und das Antigen in den Lymphknoten präsentiert, und dadurch eine Immunantwort gegen das kodierte Antigen induziert. Eine weitere Ausführungsform könnte die Konjugation eines Adjuvans 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. Die Plasmide, die für andere Moleküle oder Verbindungen kodieren, wie zum Beispiel Chemokine (zum Beispiel Defensine 1 oder 2, RANTES, MIP1- $\alpha$ , MIP-2, Interleukin-8) oder ein Cytokin (zum Beispiel Interleukin-1 $\beta$ , -2, -6, -10 oder -12;  $\gamma$ -Interferon; Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ ; oder Granozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor) (siehe Übersichtsartikel von Nohria und Rubin, 1994), ein Hitzeschock-Protein oder ein Derivat, ein Derivat des LeIF aus Leishmania major (Skeiky et al., 1995), Cholera-Toxin B, ein Derivat des Lipopolysaccharids (LPS; zum Beispiel Lipid A oder Monophosphoryl-Lipid A), oder ein Superantigen (Saloga et al., 1996), oder andere ADP-ribosylierende Exotoxine können mit Protein-Antigenen transportiert werden.

**[0070]** Andere Mittel zur Aktivierung des transkutanen Adjuvans, wie die Zugabe von Detergenzien und Phospholipid zu der Formulierung, können wirksam sein, um die CT-Aktivität durch den ADP-Ribosylierungsfaktor zu verstärken (siehe z.B. Spangler, 1992).

**[0071]** Für die Immunisierung unter Verwendung von Adjuvans- oder Antigenaktivierung kann die Modifizierung der Adjuvans- oder Antigenkomponente der Formulierung deren Wirksamkeit in parenteraler Immunisierung reduzieren, ohne dass die Verwendbarkeit der Formulierung für transkutane Immunisierung zerstört wird, wenn das Adjuvans und/oder Antigen aktiviert ist. Unerwünschte Eigenschaften (z.B. Toxizität, allergische Reaktivität und Nebenwirkungen) des Antigens oder Adjuvans in der Formulierung können durch Modifikation vermindert werden, ohne dass deren Wirksamkeit in transkutaner Immunisierung zerstört wird. Die Aktivierung eines solchen modifizierten Adjuvans 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 Adjuvans und/oder Antigen, welche die Formulierung umfasst, in einem Partikel eingekapselt sein (z.B. Mikrosphären, Nanopartikel). Die Phagozytose des Partikels kann selbst die Aktivierung einer Antigen-präsentierenden Zelle durch Hochregulieren der Expression von Haupthistokompatibilitäts-Antigenen und/oder ko-stimulatorischen Molekülen (z.B. MHC Klasse II, B7-2) verstärken.

## ANTIGEN

**[0072]** 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 anderen Organismus bzw. von einer anderen Erkrankung. Das Antigen, das durch rekombinante Mittel oder Peptidsynthese erhalten wurde, wie auch das in der Erfindung verwendete 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. Die 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. Choleratoxin, Tetanustoxoid); zusätzlich können Toxine, Toxide und Untereinheiten davon oder Kombinationen davon sowohl als Antigen als Adjuvans wirken.

**[0073]** 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.

**[0074]** Hydrophobes Antigen kann in einem Detergens aufgelöst werden, zum Beispiel ein Polypeptid, das eine membran-durchspannende 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. Opsonisierung).

**[0075]** 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).

**[0076]** Bakterien schließen zum Beispiel ein: Anthrax, Campylobacter, Cholera, Clostridia, Diphtherie, enteroxische *E. coli*, Giardia, Gonococcus, *Helicobacter pylori* oder Urease, 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 burgdorferi* und *Yersinia*; und deren Produkte.

**[0077]** 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 Immunschwächevirus (Deprez et al., 1996), menschliches Papillomvirus, Influenza, Masern, Norwalk, japanische Pferdeenzephalitis, Papillomvirus, Parvovirus B19, Polio, Tollwut, Respiratory Syncytial Virus, Rotavirus, Röteln, Masern, St. Louis Enzephalitis, Vaccinia, Vacciniakonstrukte, die Gene enthalten, die andere Antigene

wie Malaria-Antigene, Varizella und Gelbfieber kodieren; und deren Produkte.

**[0078]** 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 deren Produkte.

**[0079]** 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 Immunschwächerivirus Typen 1 und 2 (erworbenes Immunschwächesyndrom; AIDS), menschliches T-Zell-lymphotropes Virus Typ 1 (T-Zell-Leukämie), Influenza A, B und C (Atemwegserkrankung), japanisches Enzephalitisvirus (Lungenentzündung, Enzephalopathie), Masernvirus (subakute sklerosierende Panenzephalitis), Mumpsvirus (Meningitis, Enzephalitis), Papillomvirus (Warzen, Zervixkarzinom), Parvovirus (Atemwegserkrankung, Anämie), Poliovirus (Lähmung), Polyomavirus JC (multifokale Leukoenzephalopathie), Polyomavirus BK (hämorrhagische Zystitis), Tollwut-Virus (Nervenfehlfunktion), Respiratory Syncytial Virus (Atemwegserkrankung), Rhinovirus (einfache Erkältung), Rotavirus (Diarrhoe), Rubellavirus (fötale Missbildungen), Vacciniaivirus (allgemeine Infektion), Gelbfiebervirus (Gelbsucht, Nieren- und Leberversagen) und Varizella-Zoster-Virus (Windpocken).

**[0080]** 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 auftretende Infektionen), *Rickettsia* (Rocky-Mountain-Fleckfieber), *Salmonella* (typhusartiges Fieber, Gastroenteritis), *Shigella* (Dysenterie), *Staphylococcus aureus* (Eiterflechte, toxisches Schocksyndrom), *Streptococcus pneumoniae* (Lungenentzündung, Mittelohrentzündung), *Streptococcus pyogenes* (rheumatisches Fieber, Rachenentzündung), *Treponema pallidum* (Syphilis), *Vibrio cholerae* (Cholera), *Yersinia pestis* (Beulenpest).

**[0081]** 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).

**[0082]** 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* (Lungenentzündung bei AIDS), *Aspergillus fumigatus* (Aspergillose).

#### ADJUVANS

**[0083]** Die Formulierung enthält auch ein Adjuvans, obwohl ein einzelnes Molekül sowohl Adjuvans- als auch Antigeneigenschaften (z.B. Choleratoxin) (Elson und Dertzbaugh, 1994) enthalten kann. Adjuvantien sind Substanzen, die dafür verwendet werden können, spezifisch oder unspezifisch eine antigenspezifische Immunantwort zu potenzieren. Normalerweise werden das Adjuvans und die Formulierung vor der Präsentation des Antigens gemischt, aber als Alternative können sie innerhalb eines kurzen Zeitintervalls getrennt präsentiert werden.

**[0084]** Die Adjuvantien sind üblicherweise Produkte aus Bakterien, Parasiten oder sogar Viren oder Bakterien, sie können jedoch auch von anderen natürlichen oder synthetischen Quellen stammen. Die Adjuvantien umfassen zum Beispiel eine Öl-Emulsion (zum Beispiel vollständiges oder unvollständiges Freund'sches Ad-

juvans), ein Chemokin (zum Beispiel Defensin 1 oder 2, RANTES, MIP1- $\alpha$ , MIP-2, Interleukin-8) oder ein Cytokin (zum Beispiel Interleukin-1 $\beta$ , -2, -6, -10 oder -12;  $\gamma$ -Interferon; Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ ; oder Granulocyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor) (siehe den Übersichtsartikel von Nohria und Rubin, 1994), ein Muramyl-Dipeptid-Derivat (zum Beispiel Murabutid, Threonyl-MDP oder Muramyl-Tripeptid), ein Hitze-schock-Protein oder ein Derivat, ein Derivat von LeIF aus Leishmania major (Skeiky et al., 1995), Cholera-Toxin oder Cholera-Toxin B, bARES, ein Derivat eines Lipopolysaccharids (LPS; zum Beispiel Lipid A oder Monophosphoryl-Lipid A, synthetische Lipid A Analoga), oder ein Superantigen (Saloga et al., 1996), Blockcopolymeren oder andere Polymere, die im Stand der Technik bekannt sind. Siehe Richards et al., 1995 für weitere Adjuvantien, die in der Immunisierung verwendbar sind.

**[0085]** Ein Adjuvans kann ausgewählt werden, um vorzugsweise einen Antikörper oder zelluläre Effektoren, spezifische Antikörper-Isotypen (zum Beispiel IgM, IgD, IgA1, IgA2, sekretorisches IgA, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 und/oder IgG4) oder spezifische Untermengen von T-Zellen (zum Beispiel CTL, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und/oder T<sub>DTH</sub>) zu induzieren (Muñoz et al., 1990; Glenn et al., 1995).

**[0086]** CpGs gehören zu einer Klasse von Strukturen, welche Muster aufweisen, die es dem Immunsystem erlauben, ihre pathogenen Ursprünge zu erkennen, um die angeborene Immunantwort zu stimulieren, so dass es zu einer adaptiven Immunantwort kommt (Medzhitov und Janeway, 1997). Diese Strukturen werden pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) genannt, und umfassen zum Beispiel Lipopolysaccharide, Teichonsäuren, nicht-methylierte CpG-Motive, doppelsträngige RNA und Mannine.

**[0087]** PAMPs induzieren endogene Gefahrensignale, die die Immunantwort steigern, als Costimulatoren der T-Zell-Funktion wirken und die Effektor-Funktion kontrollieren können. Die Fähigkeit der PAMPs, diese Antworten zu induzieren, spielt eine Rolle in ihrem Potenzial als Adjuvantien, und ihre Zielzellen sind Antigen-präsentierende Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen. Die Antigen-präsentierenden Zellen der Haut konnten gleichermaßen durch PAMPs stimuliert werden, die durch die Haut übertragen wurden. Zum Beispiel konnten Langerhans-Zellen, eine Art von dendritischen Zellen, durch ein PAMP in Lösung auf der Haut mit einem transkutan schwach immunogenen Molekül aktiviert und induziert werden, um zu wandern und dieses schwach immunogene Molekül den T-Zellen im Lymphknoten zu präsentieren, und eine Antikörper-Antwort auf das schwach immunogene Molekül zu induzieren. PAMPs konnten ebenso in Verbindung mit anderen Haut-Adjuvantien, wie zum Beispiel dem Cholera-Toxin, verwendet werden, um unterschiedliche costimulierende Moleküle zu induzieren und unterschiedliche Effektor-Funktionen zu kontrollieren, und um die Immunantwort zu steuern, zum Beispiel von einer T<sub>H</sub>2- in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Antwort.

**[0088]** 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 heatlabiles Enterotoxin (LT), Pertussistoxin (PT), C. botulinum-Toxin C2, C. botulinum-Toxin C3, C. limosum-Exoenzym, B. cereus-Exoenzym, Pseudomonas-Exotoxin S, Staphylococcus aureus EDIN und B. sphaericus-Toxin ein.

**[0089]** 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-Untereinheiten-Pentamer, das nicht-kovalent an die A-Untereinheit gebunden ist. Das B-Untereinheiten-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 heterotrimeren GTP-Proteine (G-Proteine), einschließlich des Gs-Proteins, was zu einer erhöhten intrazellulären Menge von cyclischem AMP führt. Dies stimuliert die Freisetzung von Ionen und Flüssigkeit aus intestinalen Zellen im Fall von Cholera.

**[0090]** Choleratoxin (CT) und seine B-Untereinheit (CTB) haben Adjuvanseigenschaften, wenn sie entweder als ein intramuskuläres oder orales Immunogen verwendet werden (Elson und Dertzbaugh, 1994; Trach et al., 1997). Heatlabiles 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  $\alpha$ 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 die 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 kön-

nen sowohl bAREs als auch deren Derivative wirksam immunisieren, wenn sie epikutan in einer einfachen Lösung auf die Haut aufgebracht werden.

**[0091]** Alle lizenzierten Vakzinen erfordern einen Antikörperspiegel für die Zulassung – es wird keine andere Immunkomponente, wie die T-Zell-Proliferation, verwendet. Der 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 Pertussisvakzinen 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).

**[0092]** 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, mit den genetisch detoxifizierten Toxoiden selbst oder mit Toxoiden und Adjuvantien wie CT induziert werden. Man kann sich vorstellen, dass genetisch toxoidierte Toxine, die eine veränderte ADP-ribosylierende Exotoxinaktivität aufweisen, oder Trypsinspaltstellenmutationen oder andere Mutationen als nicht toxische Aktivatoren von Antigen-präsentierenden Zellen, die in der transkutanen 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 Toxine auf der Haut verwenden. Man würde jedoch erwarten, dass die Aktivierung durch eine Technik wie Trypsinspaltung die Adjuvansqualitäten von LT durch die Haut erhöht, die den eigenen Trypsinenzymen 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.

**[0093]** Gegebenenfalls kann ein Aktivator der Langerhans-Zellen als ein Adjuvans verwendet werden. Die Beispiele für solche Aktivatoren umfassen: einen Induktor des Hitzeschock-Proteins; einen Kontakt-Sensibilisator (zum Beispiel Trinitrochlorbenzol, Dinitrofluorbenzol, Stickstoff-Senfgas, Pentadecylcatechin); Toxine (zum Beispiel Shiga-Toxin, Staphylococcus Enterotoxin B); Lipopolysaccharid, Lipid A, oder Derivate derselben; bakterielle DNA (Stacey et al., 1996), Cytokin (zum Beispiel Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , -10, -12); Kalziumionen in Lösung; Kalzium-Ionophore, und Chemokine (zum Beispiel Defensin 1 oder 2, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, Interleukin-8).

**[0094]** Wenn ein immunisierendes Antigen ausreichende Langerhanszellen-aktivierende Fähigkeiten aufweist, dann muss ein getrenntes Adjuvans nicht erforderlich sein, wie im Fall von CT, das sowohl ein Antigen als auch ein Adjuvans darstellt. Es ist vorgesehen, dass Gesamtzellpräparationen, lebende Viren, abgeschwächte Viren, DNA-Plasmide und bakterielle DNA zur transkutanen Immunisierung ausreichend sein können, wenn ein Adjuvans vorhanden ist. Es kann möglich sein, geringe Konzentrationen von Kontaktensibilisatoren oder anderen Aktivatoren von Langerhanszellen zu verwenden, um eine Immunantwort zu induzieren, ohne Hautschäden zu induzieren.

#### PRAKTISCHE ASPEKTE DER TRANSKUTANEN IMMUNISIERUNG

**[0095]** 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 Adjuvans ausgesetzt war. Tatsächlich kann der Grund dafür, dass die transkutane Immunisierung so effizient ist,

darin liegen, dass sie auf eine größere Zahl von diesen wirksamen Antigen-präsentierenden Zellen abzielt als die intramuskuläre Immunisierung.

**[0096]** Wir sehen vor, dass die vorliegende Erfindung den Zugang zur Immunisierung verbessern wird, während eine wirksame Immunantwort induziert wird. Da die transkutane Immunisierung keine physikalische Durchdringung der Haut und daraus resultierende Komplikationen und Schwierigkeiten beinhaltet, werden die Erfordernisse für das geschulte Personal, sowie an sterile Techniken und sterile Ausrüstung verringert. Des Weiteren werden die Hindernisse für Immunisierung an mehreren Stellen oder für mehrere Immunisierungen verringert. Die Immunisierung durch eine einzelne Anwendung der Formulierung ist ebenfalls vorgesehen, aber das Auffrischen wird im Allgemeinen nötig sein. Die nadelfreie Immunisierung ist eine Priorität für die Weltgesundheitsorganisation (WHO) wegen der Wiederverwendung von Nadeln – ein Umstand, der eine Erkrankung aufgrund des Gebrauchs unsteriler Nadeln verursacht.

**[0097]** Eine Immunisierung kann erzielt werden durch Verwenden von epikutaner Anwendung einer einfachen Lösung von Antigen und Adjuvans, imprägniert in Gaze unter einer undurchlässigen Auflage oder durch Verwenden von anderen Auflagetechnologien: Cremes, Gele, durch Eintauchen, 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 angesichts des einfachen Zugangs zur Immunisierung in großem Maßstab stattfinden. Zusätzlich würde ein einfaches Immunisierungsverfahren den Zugang zur Immunisierung für pädiatrische Patienten und ältere Menschen und die Bevölkerungen in Ländern der Dritten Welt verbessern.

**[0098]** Bei früheren Vakzinen wurden ihre Formulierungen durch die Haut mit Nadeln injiziert. Die Injektion von Vakzinen unter Verwendung von Nadeln bringt bestimmte Nachteile mit sich, einschließlich der Notwendigkeit für sterile Nadeln und Spritzen, ausgebildetes medizinisches Personal, um die Vakzinen zu verabreichen, Unbehagen durch die Injektion und mögliche Komplikationen, die mit dem Punktieren der Haut mit der Nadel einhergehen. Die Immunisierung durch die Haut ohne die Verwendung von Nadeln (d.h. die transkutane Immunisierung) stellt durch das Vermeiden der zuvor erwähnten Nachteile einen wichtigen Fortschritt für den Vakzine-Transfer dar.

**[0099]** Darüber hinaus kann die 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 eines Antigens, 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 Abdomens und des 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 eines Antigens an einer einzelnen Stelle durch intradermale, subkutane oder intramuskuläre Injektion injiziert wird.

**[0100]** Das 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, Antigenpräsentierenden 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; das Antigen kann auch durch den Blutstrom oder das lymphatische System zu phagozytischen Zellen der Leber, Milz und des Knochenmarks gebracht werden, von denen bekannt ist, dass sie als die Antigen-präsentierenden Zellen dienen. Langerhanszellen, dendritische Zellen und Makrophagen können spezifisch gezielt angegriffen werden, unter Verwendung von Fc-Rezeptor, konjugiert mit Adjuvans 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.

**[0101]** Das transkutane Immunisierungssystem kann direkt auf die Haut aufgebracht werden und an der Luft getrocknet werden; es kann in die Haut oder die Kopfhaut eingerieben werden; es kann an der Stelle mit einem Verband, einer Auflage oder absorbierendem Material festgehalten werden; es kann durch Eintauchen aufgebracht werden; es kann auf andere Weise durch eine Vorrichtung wie einen Strumpf, Pantoffel, Handschuh

oder Hemd festgehalten werden; oder es kann auf die Haut gesprüht werden, um den Kontakt mit der Haut zu maximieren. Die Formulierung kann in einem absorbierenden Verband 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 & Napheu). 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.

**[0102]** 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 Adjuvans oder beide kodieren. Es würde im Allgemeinen erwartet werden, dass die Immunantwort durch die gemeinsame Verabreichung von einem Adjuvans, zum Beispiel CT, LT oder CpGs, gegenüber der Nukleinsäure, die das Antigen kodiert, verstärkt werden würde. Die Nukleinsäure kann, muss aber nicht, zur Replikation fähig sein; 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. einen Promotor, Enhancer, Silencer, Transkriptionsinitiations- und -terminationsstellen, RNA-Spleiß-Akzeptor- und -Donorstellen, ein Polyadenylierungssignal, eine 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 durch 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.

**[0103]** Eine Immunantwort kann humorale (d.h. antigenspezifische Antikörper) und/oder zelluläre (d.h. antigenspezifische Lymphozyten wie B-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CTL, Th1-Zellen, Th2-Zellen und/oder T<sub>DTH</sub>-Zellen) Effektorwaffen umfassen. Darüber hinaus kann die Immunantwort NK-Zellen umfassen, die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) vermitteln.

**[0104]** 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 verursachen.

**[0105]** 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, durch Lymphozytenproliferation durch Kultur von Lymphozyten, die mit Antigen stimuliert wurden, und durch Hypersensitivitätsantworten vom verzögerten Typ auf einen intradermalen Haut-Expositionstest mit dem Antigen allein.

**[0106]** In einem viralen Neutralisierungstest werden Reihenverdünnungen von Seren zu Wirtszellen hinzugefügt, die dann nach der Exposition mit einem infektiösen Virus auf eine Infektion hin beobachtet werden. Als Alternative können Reihenverdünnungen von Seren mit infektiösen Titern eines Virus vor der Impfung eines Tieres inkubiert werden, und die geimpften Tiere werden dann auf Anzeichen einer Infektion beobachtet.

**[0107]** Das transkutane Immunisierungssystem der Erfindung kann unter Verwendung von Expositions-Modellen entweder in 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 einer Exposition wird zum Beispiel generell angenommen, dass das Erreichen eines anti-Diphtherie-Antikörpertiters von 5 IU/ml oder darüber hinaus einen optimalen Schutz anzeigt und als Ersatzmarker für Schutz dient (Plotkin und Mortimer, 1994).

**[0108]** Eine 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, eine Proliferation von CTLs und Lymphozyten 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. 5,538,866) und Lymphom (US-Patente Nr. 4,816,249, 5,068,177 und 5,227,159). Die 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; Vandebark et al., 1996). Das US-Patent Nr. 5,552,300 beschreibt ebenfalls Antigene, die für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen geeignet sind.

**[0109]** Das Folgende soll die vorliegende Erfindung beispielhaft erläutern, wobei das Beispiel 17 nicht unter den Schutzbereich der Ansprüche fällt; die Ausübung der Erfindung ist jedoch in keiner Weise begrenzt oder durch die Beispiele eingeschränkt.

## BEISPIELE

### Immunisierungsverfahren

**[0110]** 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 eine 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 verdunsten. Die Hydratation des Rückens wird durch sanftes Reiben des Rückens mit einem sterilen, wassergesättigten Gazetupfer erreicht, 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  $\leq 100 \mu\text{g}$  Antigen und Adjuvans in 100  $\mu\text{l}$  Endvolumen – unter Verwendung einer Pipette und Spitze auf den Rücken aufgetragen, 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 langsamen, 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 Heizmatratten platziert, bis sie (die Tiere) sich vollständig von der Anästhesie erholt haben.

### Messung von menschlichen anti-LT-Antikörpertitern

**[0111]** 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-GM<sub>1</sub> (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( $\gamma$ )-HRP (Kirkegaard und Perry, Gaithersburg, MD) und 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazololin)-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 CD 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( $\alpha$ )-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 das IgA im Gesamtserum wurden unter Verwendung von nicht markiertem Ziegen-anti-Mensch-IgA (Kirkegaard und Perry), und dann wie oben blockiert und schließlich durch Auftragen von Reihenverdünnungen eines IgA-Standards bestimmt.

## Beispiel 1.

**[0112]** Es wird angenommen, dass das 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 das 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 infolge einer transkutanen Immunisierung mit dieser Penetrationsförderungsmethode beobachtet 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-Präptupfer abgewischt, der 70 % Isopropanol („Isopropanol“) enthielt. Man ließ den Alkohol für ca. 5 Minuten verdunsten. 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.

**[0113]** 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 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 die 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.

Tier Nr.	anti-CT-IgG (H+L)ELISA-Einheiten		
	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.

**[0114]** Um abzuschätzen, ob die chemische Penetrationsförderung allein die transkutane Immunisierung steigern kann, wurde ein Detergens auf der Haut verwendet. 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden anästhesiert 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 mit 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, und anschließend wird jegliches überschüssiges SDS mit einem trockenen Gazetupfer abgetupft. SDS kann in einem Träger, wie zum Beispiel einem Tupfer, auf die Haut aufgebracht werden, und dann kann das überschüssige SDS mit einem trockenen Gazetupfer entfernt werden.

**[0115]** Danach wurden die Tiere hydratisiert und wie die „Wasser“-Gruppe immunisiert. Das Entfernen von überschüssigem Antigen erfolgte wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben.

**[0116]** 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.

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

### Beispiel 3.

**[0117]** 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 anästhetisiert und, wie im „Immunisierungs-verfahren“ 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 mit „Nair®“ behandelten Gruppe vierundzwanzig Stunden nach dem Rasieren mit 100 ml einer Nair®-Creme für ca. 12 Minuten behandelt, und dann wurde die Formulierung mit einem Gazetupfer abgewischt, 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.

**[0118]** 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 die chemische Störung der Hautoberfläche mit Kalziumhydroxid, dem aktiven Inhaltsstoff der 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<sup>®</sup>) behandelt wurde.

Tier Nr.	anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Behandlung	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 2
546	Wasser		4629
547	Wasser		3154
548	Wasser		7288
549	Wasser		1719
550	Wasser		11779
<hr/>			
geometrisches Mittel			3678
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		5	
<hr/>			
581	Nair <sup>®</sup>		17621
582	Nair <sup>®</sup>		12261
583	Nair <sup>®</sup>		7235
584	Nair <sup>®</sup>		7545
585	Nair <sup>®</sup>		5997
<hr/>			
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.	anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Behandlung	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 3
546	Wasser		22525
547	Wasser		8939
548	Wasser		11885
549	Wasser		5121
550	Wasser		37770
<hr/>			
geometrisches Mittel			10521
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		11	
<hr/>			
581	Nair®		34222
582	Nair®		45674
583	Nair®		50224
584	Nair®		27270
585	Nair®		21832
<hr/>			
geometrisches Mittel			38251
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		15	

#### Beispiel 4.

**[0119]** Weitere Studien wurden durchgeführt, um die Wirkung der chemischen 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, und dann wurde das überschüssige Wasser entfernt und 25 µg CT wurden topisch aufgetragen. Das Entfernen von überschüssigem Antigen wurde durchgeführt wie im „Immunisierungsverfahren“ beschrieben.

**[0120]** 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 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.	anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Behandlung	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	
<hr/>			
756	Salicylat/Wasser		2279
757	Salicylat/Wasser		4581
758	Salicylat/Wasser		4658
759	Salicylat/Wasser		2771
760	Salicylat/Wasser		593
<hr/>			
geometrisches Mittel			2402
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		36	

#### Beispiel 5.

**[0121]** Um die Rolle der physikalischen/mechanischen 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.

**[0122]** 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.

**[0123]** Diese einfache Vorrichtung könnte durch andere physikalische Störungsvorrichtungen ersetzt werden, um Antigene und Adjuvantien 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 Hautschicht geeignete Vorrichtungen, von denen bekannt ist, dass sie nur das Stratum Corneum oder die oberflächliche Epidermis angreifen.

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.	anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	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	
<hr/>			
7151	Nagelfeile		6632
7152	Nagelfeile		9380
7153	Nagelfeile		31482
7154	Nagelfeile		11142
7155	Nagelfeile		11761
<hr/>			
geometrisches Mittel			12074
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		9	

#### Beispiel 6.

**[0124]** Ein weiteres Mittel für die physikalische/mechanische Penetrationsförderung wurde in Form eines Schleifmittels angewandt, um einen Teil des Stratum Corneum zu entfernen und einen 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 abgewischt, der mit Wasser gesättigt war, und dann wurden die Rücken der Tiere 10 Sekunden mit einem Nylon-schwamm buf-puf® („buf-puf®“) gerieben, 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.

**[0125]** 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.

**[0126]** Diese einfache Vorrichtung könnte durch andere physikalische Penetrationsvorrichtungen ersetzt werden, um Antigene und Adjuvantien in die Epidermis zu bringen, wie eine Nadel und Tuberkulinspritze, die für eine 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 Saccharose oder Natriumchlorid, oder biologisch abbaubare Polymere, die in die Auflage imprägniert wurden und auf der 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.	anti-CT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	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	
<hr/>			
7166	buf-puf®		5376
7167	buf-puf®		2319
7168	buf-puf®		1209
7169	buf-puf®		2871
7170	buf-puf®		2785
<hr/>		<hr/>	
geometrisches Mittel			2607
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		8	

#### Beispiel 7.

**[0127]** 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 Adjuvans wie CT (86 kDa) als ein Adjuvans auf der Haut wirken kann, würde man jedoch erwarten, dass andere Adjuvantien stimulatorisch wären, insbesondere jene, die auf bakteriellen Produkten oder Motiven basieren, wenn sie in einer Weise auf der Haut platziert würden, welche die Haut hydratisiert und/oder wenn Penetrationsförderer verwendet würden.

**[0128]** 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 verdunstet 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 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 „Immunisierungs-verfahren“ 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 (H+L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7a gezeigt.

**[0129]** 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): TCCATGACGTTCCTGACGTT), zu einem nachweisbaren Anstieg im Serum-anti-DT-IgG-Titer in 5 von 5 Tieren. Es hat daher den Anschein, dass eine bakterielle DNA, die entsprechende Motive wie CpGs (6 kDa) enthält, als Adjuvans verwendet werden kann, um den Transfer von Antigen durch die Haut zur Induktion von antigenspezifischen Antikörperantworten zu verstärken.

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

Tier Nr.	anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Adjuvans/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	

**[0130]** Die transkutane Wirkung der transkutanen 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 verdunstet 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 das Medium oder das Antigen (DT) wurde in einem standardmäßigen 4-Tage-Proliferationstest unter Verwendung eines <sup>3</sup>H-Einbaus 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): TCCATGACGTTCCTGACGTT) enthielt, führte zu einem nachweisbaren Anstieg in der antigenspezifischen proliferativen Antwort. Es hat daher den Anschein, dass eine bakterielle DNA, die entsprechende Motive enthält, als Adjuvans verwendet werden kann, um den Transfer von Antigen durch die Haut zur Induktion von proliferativen Antworten zu verstärken.

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

in vivo angewandte Antigene	Proliferation (cpm) $^3\text{H}$ -Einbau in vitro in Antigene	
	Medium	DT
Normale LK	339	544
CpG1/DT	1865	5741

## Beispiel 8.

**[0131]** 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/US 97/21324 – WO 98/20734) beschrieben. Vorausgesetzt, dass ein Adjuvans wie CT als ein Adjuvans auf der Haut wirken kann, würde man jedoch erwarten, dass andere Adjuvantien stimulatorisch wären, insbesondere jene, die auf bakteriellen Produkten oder Motiven basieren, wenn sie in einer Weise auf der Haut platziert würden, welche die Haut hydratisiert. 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 beibehalten hat. 100 µg Diphtherietoxoid (DT) wurden als Antigen verwendet.

**[0132]** Die anti-DT-Antikörpertiter wurden unter Verwendung von ELISA, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H+L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 gezeigt. Die anti-DT-Titer waren deutlich erhöht im Serum von Tieren, die entweder mit LTK63 oder LTR72 und DT immunisiert worden waren, verglichen mit Titern 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 Adjuvantien auf der Haut.

Tier Nr.	anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Adjuvans/Antigen	Kontrollblut vor Immunisierung	Woche 7
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.

**[0133]** 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. TNF $\alpha$  ist auch dafür bekannt, dass es eine Verbindung ist, die Langerhanszellen aktiviert.

**[0134]** 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 verdunstet war (ungefähr 5 Minuten), wurden 100  $\mu$ l phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), enthaltend 0,83  $\mu$ g TNF-alpha (rekombinantes Maus-TNF-alpha, Endogen), IL-2 (1  $\mu$ g rekombinantes Maus-IL-2 (Sigma)) oder Schein-Adjuvans (CpG2), auf die Haut des Rückens aufgetragen, zusammen mit 100  $\mu$ 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 wurden unter Verwendung eines ELISA-Tests, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H+L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 gezeigt.

**[0135]** Die gemeinsame Verabreichung von DT und einem Schein-Adjuvans (CpG2) induzierte keinen nachweisbaren Anstieg in den anti-DT-Titern. Im Gegensatz dazu ergab die topische Anwendung von TNF-alpha (0,8  $\mu$ g) einen nachweisbaren Anstieg im Serum-anti-DT-IgG-Titer bei 3 von 5 Tieren im Vergleich entweder mit anti-DT-Titern der mit einem Schein-Adjuvans behandelten Mäuse, oder mit Seren, die vor der Immunisierung gesammelt wurden (Kontrollblut vor Immunisierung). In ähnlicher Weise ergab die topische Anwendung von IL-2 (1  $\mu$ g) einen messbaren Anstieg im Serum-anti-DT-IgG-Titer bei 4 von 5 Tieren im Vergleich entweder mit anti-DT-Titern von mit Schein-Adjuvans behandelten Mäusen, oder mit 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 Adjuvantien auf der Haut verwendet werden können, und dass Verbindungen, die Langerhanszellen aktivieren, für die transkutane Immunisierung verwendet werden können.

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

Tier Nr.	anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Adjuvans/Antigen	Kontrollblut vor Immuni-sierung	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	
<hr/>			
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
<hr/>		<hr/>	
geometrisches Mittel			61
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		2	
<hr/>			
7266	CpG2/DT		19
7267	CpG2/DT		12
7268	CpG2/DT		5
7269	CpG2/DT		5
7270	CpG2/DT		11
<hr/>		<hr/>	
geometrisches Mittel			9
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		5	

Beispiel 10.

**[0136]** Die B-Untereinheit von Choleratoxin ist eine andere Klasse von Adjuvantien, der die A-Untereinheit und damit die ADP-Ribosyltransferaseaktivität von CT fehlt. Als solche stellt CTB ein Adjuvans dar, das einzigartig ist und nützlich sein kann, weil es nicht toxisch ist, wenn es in den Verdauungsapparat aufgenommen wird.

**[0137]** 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 verdunstet war (ungefähr 5 Minuten), wurden 100 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), enthaltend 100 µg aufgereinigte Choleratoxin 8-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 im "Immunisierungsverfahren" beschrieben. Die Immunisierung wurde 4 und 8 Wochen später wiederholt. Zehn Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren Blutproben entnommen, und die anti-DT-Titer wurden unter Verwendung eines ELISA-Tests, wie oben beschrieben für "ELISA-IgG (H+L)", bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 gezeigt.

**[0138]** 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 mit jenen im Serum der Kontrollblutprobe vor der Immunisierung, wie in Tabelle 10 gezeigt. Es hat daher den Anschein, dass aufgereinigtes CTB als Adjuvans auf der Haut verwendet werden kann.

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

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

Beispiel 11.

**[0139]** Adjuvantien, die strukturell unterschiedlich sind, werden ihre Verstärkung wahrscheinlich durch unterschiedliche Wirkungen erzielen. Adjuvantien, 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 Adjuvantien gleichzeitig die Antwort auf die transkutane Immunisierung im Vergleich zu den individuellen Adjuvantien allein förderte.

**[0140]** 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 verdunstet war (ungefähr 5 Minuten) wurde 100 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), enthaltend 100 µg der immunstimmulatorischen DNA (CpG1) und/oder 100 µg Choleratoxin (CT), auf dem Rücken mit 100 µg eines löslichen Antigenextrakts aus *Leishmania* (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 "Immunisierungs-verfahren" 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 das Medium oder das Antigen (SLA) wurde in einem standardmäßigen 4-Tage-Proliferationstest unter Verwendung eines <sup>3</sup>H-Einbaus als ablesbares Ergebnis festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 gezeigt.

**[0141]** Die gemeinsame Verabreichung von SLA und CpG1 (immunstimmulatorische DNA, die ein nicht-methyliertes CpG Dinukleotid, flankiert durch zwei 5'-Purine und zwei 3'-Pyrimidine, enthält: TCCATGACGGTT-CCTGACGTT), oder CT führte zu einem nachweisbaren Anstieg in der antigenspezifischen, proliferativen Ant-

wort. 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 stammen, die dem jeweiligen Adjuvans allein ausgesetzt waren. Es hat daher den Anschein, dass die bakterielle DNA, die entsprechende Motive enthält, mit ADP-ribosylierenden Exotoxinen wie CT als Adjuvans auf der Haut synergetisch wirken kann, um höhere Immunantworten zu induzieren als jedes Adjuvans allein.

Tabelle 11. Synergie zwischen der immunstimulatorischen DNA und dem ADP-ribosylierenden Exotoxin (CT) als Adjuvantien, wenn sie auf die Haut aufgetragen werden.

in vivo aufgetragene Substanzen	in vitro Proliferation (cpm) $^3\text{H}$ -Einbau in Antigene	
	Medium	SLA
normaler LK	180	219
SLA	200	159
SLA/CpG1	1030	2804
SLA/CT	232	2542
SLA/CpG1/CT	2232	47122

Beispiel 12.

**[0142]** Die transkutane Immunisierung induziert wirksame Immunantworten, wenn sie allein als Transferverfahren verwendet wird. Wir haben auch herausgefunden, dass die transkutane Immunisierung nacheinander mit anderen Transferwegen verwendet werden kann, um eine Immunantwort zu stimulieren.

**[0143]** 6 bis 8 Wochen alte BALB/c Mäuse. Am Tag 0 erhielten beide Tiergruppen eine 50  $\mu\text{l}$  intramuskuläre (im.) Injektion von DT (5  $\mu\text{g}$ ), gemischt mit Alaun (Rehydrogel – 25  $\mu\text{g}$  in NaCl) in den hinteren Oberschenkel. Acht und 16 Wochen später wurden die Mäuse der im/tc/tc Gruppe rasiert, anästhesiert und über den transkutanen Weg immunisiert, wie beschrieben für das "Immunisierungsverfahren", unter Verwendung von 100  $\mu\text{g}$  Choleratoxin als Adjuvans und 100  $\mu\text{g}$  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.

**[0144]** Eine einzelne im. Injektion von 5  $\mu\text{g}$  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 auffrischungsgeimpften 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) auffrischungsgeimpft werden können. Verschiedene Kombinationen von TCI Erstimmunisierung oder Auffrischungsimpfung über andere Wege und Schemata kann man sich vorstellen, einschließlich des oralen, bukkalen, nasalen, rektalen, vaginalen, intradermalen Wegs, durch Kanonen oder andere Mittel des Transports. Zusätzlich können sich Antigene in Weg und Zusammensetzung unterscheiden, einschließlich Protein abwechselnd mit Glykoprotein, Untereinheit mit Holotoxin, DNA Erstimmunisieren und anschließendes Immunisieren mit Protein, Nukleinsäure über im. und anschließendes Immunisieren mit 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 Vakzinen, wie die von Influenzavakzinen, 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.	anti-DT-IgG (H+L) ELISA-Einheiten			
	Adjuvans/Antigen	Verabreichungs-weg	Kontrollblut vor Im-munisierung	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			20	
geometrisches Mittel				
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung			10	
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	
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	

## Beispiel 13.

**[0145]** Weil TCI das Immunsystem in einer solch wirksamen Weise zu stimulieren scheint, ist es möglich, dass ein Adjuvans, das an einer Stelle auf der Haut platziert wurde, als ein Adjuvans für ein Antigen wirkt, das an einer anderen 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 den wasserbehandelten Ohren abgetupft, und Adjuvans (50 µg CT) und/oder Antigen (100 µg Rinderserumalbumin (BSA)) wurden 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 wurde 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.

**[0146]** 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 Adjuvans 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 Adjuvans auf verschiedenen (linkes und rechtes) Ohren erhalten hatten. Die Tiere, die Antigen auf dem einen Ohr und Adjuvans 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 Adjuvans können daher während der TCI an verschiedenen Stellen topisch aufgetragen werden, um eine humorale Immunantwort auszulösen. Es wird erwartet, dass diese Immunstimulation mit einem Antigen auftreten kann, das über verschiedene Wege transportiert wird, und man kann sich Schemata vorstellen, einschließlich oraler, bukkaler, nasaler, rektaler, vaginaler, intradermaler Transport-Wege, durch Kanonen oder durch andere Mittel des Transports. Zusätzlich können Adjuvantien mit einer Nukleinsäureimmunisierung verwendet werden, um die Antwort zu verstärken. Ein solcher Transport muss nicht notwendigerweise gleichzeitig erfolgen, um die Immunantwort zu verstärken. Zum Beispiel kann einer im. Injektion von Plasmid-DNA später eine transkutane Verabreichung eines Adjuvans folgen. Die Immunstimulation durch CT, LT, TNF $\alpha$ , CpGs oder ähnliche Adjuvantien ist ein überraschendes Ergebnis, weil man glaubte, dass Moleküle von 5000 Dalton die Haut nicht durchdringen können.

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

Tier Nr.	anti-BSA-IgG (H+L) ELISA-Einheiten		
	Adjuvans/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	BSA linkes Ohr		nicht erhältlich
Gruppe G	BSA linkes Ohr		15
<hr/>			
Geometrisches Mittel			61
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		6	
<hr/>			
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
<hr/>			
Geometrisches Mittel			25053
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		3	
<hr/>			
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
<hr/>			
Geometrisches Mittel			1939
vereinigtes Kontrollblut vor Immunisierung		15	

## Beispiel 14. Transkutane Immunisierung bei Menschen

**[0147]** 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 nicht-klebenden Rückseite bereitgestellt werden. Auflagen mit einer nicht-klebenden Rückseite können durch nicht-klebende 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, wur-

de eine Phase 1 Studie unter Verwendung von LT durchgeführt, um zu versuchen, Serum anti-LT Antikörper zu induzieren. Sechs Freiwillige erhielten eine Dosis von 500 µg LT, eine Dosis ähnlich der von oralen Adjuvansdosen, 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 in<sup>2</sup> Baumwollgazeauflage mit Polyvinylrückseite absorbiert war und durch eine 4 × 4 in<sup>2</sup> Tegaderm™ Wundaufage bedeckt wurde. Die Immunisierung wurde durch Platzieren der Auflage auf nicht-manipulierter 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 Platzieren der Auflage auf nicht-manipulierter 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 wurde 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 CD von 1,0 ergibt. Anti-LT-IgA wurde in gleicher Weise bestimmt wie anti-LT-IgG unter Verwendung von Ziege-anti-Mensch-IgA (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, reagierten 6 von 6 Personen mit einem Anstieg anti-LT-IgG- oder IgA-Antikörper im Serum, definiert als ein vierfacher Anstieg in Antikörpertitern. Der mittlere Faktor des Anstiegs 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.

**[0148]** Geeignete Auflagenmaterialien sind bereits beschrieben worden. Im Allgemeinen kann die Auflage beispielsweise aus einer druckempfindlichen Wundaufage, einer Grundsubstanz für eine absorbierende Schicht, die Vakzinen und Adjuvans trägt, einer vakzineundurchlässigen Rückseite und einer Abgabeschicht bestehen. Diese und andere geeignete Auflagenbeispiele sind beschrieben in dem US Patenten Nr. 4,915,950 und 3,734,097.

**[0149]** Die Auflagen können so hergestellt werden, dass sie gewebte und nicht-gewebte Grundsubstanzen von Materialien einschließen, wie beispielsweise Polyester/Zellulose, Polypropylen, Polyester, Polyester/Kunstseide und ähnliches.

**[0150]** Beispiele für nicht-gewebte Auflagengrundsubstanzen können einschließen: BBA Vliese

- a. Sorte # 1313290, nass beschichtetes Vlies, Zusammensetzung = Polyester/Zellulose, 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/unstseide, Gewicht (gsy) = 30,5, Gewicht (gsm) = 36,4, Dicke (mils) = 13,2, Stabilität MD = 5,5, Stabilität CD = 1,1.
- e. Sorte # 140-027, wasserstrahl-verlegtes Vlies, Zusammensetzung = Polyester/Kunstseide, Gewicht (gsy) = 28,0, Gewicht (gsm) = 33,5, Dicke (mils) = 22,4, Stabilität MD = 10,4, Stabilität CD = 3,8.

**[0151]** 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 Faktor des Anstiegs 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.

**[0152]** Es wurde gezeigt, dass LT wirksam für die Immunisierung von Menschen über den transkutanen Weg ist. Wir haben auch herausgefunden, dass LT als ein Adjuvans 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 verdunstet 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.

**[0153]** 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 der Immunisierung. Es hat daher den Anschein, dass das hitzelabile Enterotoxin (LT) als Adjuvans auf der Haut verwendet werden kann.

Tabelle 15. Verwendung von hitzelabilem Enterotoxin (LT) von E. coli als Adjuvans auf der Haut.

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

## Beispiel 16.

**[0154]** Um die Rolle der physikalischen/mechanischen Penetrationsförderung abzuschätzen, wurden die oberflächigen Schichten des Stratum Corneum durch Abziehen (Abreißen) eines Klebebandes entfernt. Das Abreißen eines Klebebandes 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 den 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 durchgeführt, indem man Scotch Cellophan-Klebeband auf den Rücken anbrachte, das Klebeband auf der Hautoberfläche für 3 Minuten binden ließ, und anschließend das Klebeband sanft entfernte. 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“.

**[0155]** Die anti-CT Antikörpertiter wurden mittels eines ELISA-Tests, wie oben beschrieben für "ELISA-IgG (H+L)", unter Verwendung von Seren bestimmt, die 11 Tage nach der ersten Immunisierung entnommen wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 gezeigt. CT 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 Tieren, die nicht nach der Methode des „Klebebandabreißens“ behandelt wurden. Es hat daher den Anschein, dass eine physikalische Störung der Hautoberfläche unter Verwendung von Klebebandabreißen den Transfer von Antigen über den transkutanen Weg fördert.

**[0156]** 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 die 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 ver-

wendet 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 abzugrenzen, 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.

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

#### Beispiel 17.

**[0157]** Es können Nukleinsäuren, wie Plasmid-DNA oder -RNA, verwendet werden, um eine Immunantwort zu induzieren, und diese sind im Stand der Technik gut bekannt. Die Verwendung von Nukleinsäuren in transkutaner Immunisierung wurde in früheren Patenten beschrieben (PCT/US 97/21324). Die Verwendung von Nukleinsäuren (auch als genetische Immunisierung bekannt) auf der Haut mit Penetrationsförderungstechniken wird in dem folgenden Beispiel veranschaulicht.

**[0158]** 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 verdunstet 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 3x 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.

**[0159]** Anti-Influenza-Titer wurden unter Verwendung einer Zubereitung eines gespaltenen Virusantigens (Fluzon) bestimmt, um die ELISA-Platten zu beschichten. 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 Adjuvans (LT) verstärkte diese Antwort weiter. Daher kann DNA auf der Haut verwendet werden, um Immunantworten auf Vakzine-Antigene zu induzieren und ihre Wirksamkeit kann durch die Zugabe von Adjuvans, und Penetrationsförderung 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)			
		Kontrollblut vor Immunisierung	Tag 16 nach Immunisierung		
Antigen/Adjuvans	Eingriff	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.

**[0160]** Die transkutane Immunisierung (TCI) ermöglicht wegen des einfachen Transfers, dass die Anwendung über verschiedene drainierende 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 Influenzahämagglobulin (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 (H+L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 gezeigt.

**[0161]** Die anti-HA-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 aufgebracht werden entweder an einer einzelnen oder an mehreren Stellen auf der Haut.

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

Tier	Antigen/Adjuvans	anti-HA-IgG (ELISA-Einheiten)		
		Kontrollblut vor der Immunisierung	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.

**[0162]** Die Vielzahl von Antigenen, die durch TCI eingebracht werden kann, wird weiter durch die Verwendung einer mit Polysaccharid konjugierten Vakzine veranschaulicht, um anti-Polysaccharid-Antikörper 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 influenza B Polysaccharid (Hib-PS) bei 0, 3 und 5 Wochen immunisiert. Sieben Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen, und die anti-Hib-PS-Titer wurden unter Verwendung eines ELISAs, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H+L)“, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 gezeigt.

**[0163]** 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 die Anwendung am Menschen und repräsentiert eine wichtige Strategie für die Immunisierung.

Tabelle 19. Transfer eines konjugierten Polysaccharids durch transkutane Immunisierung.

Ohrmarke Nr.	Antigen/Adjuvans	anti-Hib PS IgG ( $\mu$ g/ml)	
		Kontrollblut vor der Immunisierung	7 Wochen
1	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/100 $\mu$ g)	< 0,20	< 0,20
2	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/100 $\mu$ g)	< 0,20	< 0,20
3	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/100 $\mu$ g)	< 0,20	1,68
4	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/100 $\mu$ g)	< 0,20	< 0,20
5	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/100 $\mu$ g)	< 0,20	1,86
6	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/25 $\mu$ g)	< 0,20	1,04
7	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/25 $\mu$ g)	< 0,20	< 0,20
8	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/25 $\mu$ g)	< 0,20	< 0,20
9	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/25 $\mu$ g)	< 0,20	6,30
10	CT/Hib-PS (100 $\mu$ g/25 $\mu$ g)	< 0,20	< 0,20

## Beispiel 20.

## Transkutane Immunisierung von Mäusen mit Vakzine-Antigenen für die Anwendung am Menschen

**[0164]** Es ist gezeigt worden, dass CT als Adjuvans für die transkutane Immunisierung mit einzelnen Toxoiden und BSA wirken kann. Wir haben Mäuse mit einer Vielzahl von Vakzine-Antigenen für die Anwendung am Menschen transkutan immunisiert, einschließlich einer multivalenten Toxoidvakzine (Tetanus und Diphtherietoxoid), einem hefeexprimierten rekombinanten Protein (HIV p55 gag) und ganzen abgetöteten Tollwut-Viren unter Verwendung von CT als Adjuvans, 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 umfassen: 100/50/50  $\mu$ g CT/TT/DT über TCI gegen 3/1/1 für Alaun/TT/DT IM; 100/100  $\mu$ g für LT+DT gegen 100  $\mu$ g DT allein ein. 100/100  $\mu$ g für CT/p55 über TCI gegen 100  $\mu$ g p55 allein. Mäuse, die mit 17 IE des abgetöteten Tollwut-Virus ( $n = 10$ ) immunisiert worden waren, wurden 2x intramuskulär erstimmunisiert und dann transkutan (17 IE) aufgefrischt nach leichtem Alkoholwischen der Haut und mit 3x IM Tollwut-Immunisierung verglichen. Es wurden Antikörperspiegel gegen DT, TT, p55 und Tollwut unter Verwendung eines ELISA-Tests bestimmt, 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.

**[0165]** Die TCI-Auffrischung von Tieren, die erstmals IM immunisiert wurden, ergab auch einen signifikanten Anstieg in anti-Tollwut-Titern in allen 10 getesteten Tieren (0,53 bis 1,03 IU,  $p < 0,02$ , Student's t-test). Die An-

tikörper gegen die Antigene DT und p55, die ohne Adjuvans verabreicht wurden, waren sehr niedrig oder nicht nachweisbar – ein Umstand, der mit unseren früheren Beobachtungen übereinstimmte, dass Antigene nur schwach immunogen sind, wenn sie ohne Adjuvans aufgetragen werden. LT wirkte auch als Adjuvans (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 für eine Vielzahl von Vakzinen für die Anwendung am Menschen aus einer Vielzahl von Quellen und einer Vielzahl von Größen verwendet werden kann, so dass LT als Adjuvans für gemeinsam verabreichte Vakzine-Antigene wirken kann.

Tabelle 20. Mausantikörperantworten auf Vakzine-Antigene für die Anwendung am Menschen, verabreicht durch TCI.

Immunisierung des/r Antigens/e für TCI	Antikörperspezifität	TCI (ELISA-Einheiten)	IM/Alaun (ELISA-Einheiten)
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 Tollwut-Virus	anti-G Protein	1,03 (IU/ml) (0,31-2,77)	7,54 (IU/ml) (3,31-17,47)

ND = nicht durchgeführt

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

#### Beispiel 21.

##### Langerhans'sche Zellaktivierung

**[0166]** Bei zwei Versuchspersonen wurden die Immunisierungsstelle und der gegenüberliegende nicht-immunisierte Arm biopsiert, zum Zeitpunkt von 24 Stunden nach der Immunisierung und zum Zeitpunkt von 48 Stunden nach der zweiten Immunisierung. Eine Hämatoxilin- und Eosin-Färbung (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 eine 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 Befunde wurden unter Verwendung von anti-HLA-DR und anti-S-100 gemacht, 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 durch Lipopolysaccharide aus der Mundflora (Noble) chronisch aktiviert sind.

**[0167]** Wegen der begrenzten Größe und Anzahl von menschlichen Haut-Biopsieproben, die untersucht wurden, sind komplementäre Mausstudien durchgeführt worden. Die LC-Aktivierung in Maussystemen bei Verwendung von Kontaktensensibilatoren, LPS und entzündungsfördernden Cytokinen, ist gekennzeichnet sowohl durch 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 die 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 – Merk-

male der LC-Aktivierung (Aiba) ([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 beschrieben (Pierre, Aiba, Jakob).

**[0168]** Immunisierungsverfahren, das für Beispiel 22 verwendet werden kann. BALB/c Mäuse können mit #40 Haarschneidegerät rasiert werden. Dieses Rasieren kann ohne irgendwelche Anzeichen einer Verletzung der Haut durchgeführt werden. Das Rasieren kann durchgeführt werden von der Mitte des Brustkorbs bis gerade unterhalb des Nackens. Die Mäuse können dann für 24 Stunden ruhen. 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 von 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.

**[0169]** 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 großer, 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 cm<sup>2</sup> 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.

**[0170]** 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 würden 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

**[0171]** Die folgenden Antigene könnten für die Immunisierung und den 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. CV-XA-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); hitzelabiles 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)

**[0172]** 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.

**[0173]** Die Aktivierung von LT kann unter Standardreaktionsbedingungen durchgeführt werden durch Inkubieren des LTs mit Trypsin (oder Trypsin immobilisiert auf Kugelchen) mit oder ohne reduzierende 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 (Lämmli, 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 mit Trypsin oder nicht-behandelt, kann mit einem Dithiothreitol enthaltenden Puffer gemischt und für 5 min vor der SDS-PAGE Analyse auf 100°C erhitzt werden. Trypsinbehandeltes LT könnte ein proteolytisches Fragment von 21 kDa 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 Dalton 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 Trypsin-behandeltes 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-Trypsin-behandeltes LT eine geringe oder eine nicht nachweisbare Aktivität zeigt, während man erwarten würde, dass Trypsin-behandeltes LT eine ähnliche Aktivität aufweist wie jene, die durch CT gezeigt wird.

#### Beispiel 23.

**[0174]** 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.

**[0175]** 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 verdunstet 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 am 0. Tag mit CT allein immunisiert (100 µg in 50 µl), und mit CT plus DT (100 µg jeweils in 100 µl Volumen) nach 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 bestimmt, wie oben beschrieben für „ELISA-IgG (H+L)“. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 gezeigt.

**[0176]** Die anti-DT-Titer waren deutlich erhöht im Serum von all den Tieren, die mit CT und DT immunisiert worden waren, im Vergleich zu Tieren im Serum derselben 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 den 30-, 60- und 120-Minuten-Gruppen beobachtet wurden. Es hat daher den Anschein, dass eine 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		30255	
380	120 min		25149	

## REFERENCES

- 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.
- Antel, J. P., et al. (1996) Immunotherapy for multiple sclerosis: From theory to practice. *Nature Medicine*, 2: 1074-1075.
- Ausubel, F. M., et al. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.
- Bathurst, I. C., et al. (1993) An experimental Vaccine cocktail for *Plasmodium falciparum* malaria. *Vakzine*, 11: 449-456.
- Blum, H. E. (1995) Variants of hepatitis B, C and D viruses: Molecular biology and clinical significance. *Digestion*, 56: 85-95.
- Bodanszky, M. (1993) *Peptide Chemistry*, Springer-Verlag, New York.
- Bos, J. D. (1997) The skin as an organ of immunity. *Clin. Exp. Immunol.*, 107 (suppl. 1): 3-5.
- Burnette, W. N., et al. (1994) Recombinant microbial ADP-ribosylating toxins of *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, and enterotoxigenic *Escherichia coli*: Structure, function, and toxoid Vaccine Development. In: *Bio-process Technology*, (Eds. Burnette, W. N., et al.), pp. 185-203.
- 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.
- 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.
- Chang, S. P., et al. (1994) Regulation of antibody specificity to *Plasmodium falciparum* merozoite surface pro-

- tein-1 by adjuvant and MHC haplotype. *J. Immunol.*, 152: 3483-3490.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dahl, M. V. (1996) Atopic dermatitis. In: *Clinical Immunodermatology*, 3rd Ed. Mosby, St. Louis, pp. 345-352.
- 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.
- Deprez, B., et al. (1996) Comparative efficiencies of simple lipopeptide constructs for in vivo induction of virus-specific CTL. *Vaccine*, 14: 375-382.
- Deutscher, M. P. (1990) *Guide to Protein Purification*, Academic Press, San Diego.
- Dickenson, B. L., and Clements, J. D. (1995) Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect. Immun.*, 63: 1617-1623.
- Dragunsky, E. M., et al. (1992) Experimental evaluation of antitoxic protective effect of new cholera vaccines in mice. *Vaccine*, 10: 735-736.
- Elson, C. O., and Dertzbaugh, M. T. (1994) Mucosal Adjuvants. In: *Handbook of Mucosal Immunology* (Eds. Ogra, P. L., et al.) Academic Press, San Diego, p. 391.
- Finkelstein, R. A., and LoSpallutto, J. J. (1969) Pathogenesis of experimental cholera: Preparation and isolation of choleraen and choleraenoid. *J. Exp. Med.* 130: 185-202.
- Fonseca, B. A., et al. (1994) Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 12: 279-285.
- Frankenburg, S., et al. (1996) Effective immunization of mice against cutaneous leishmaniasis using an intrinsically adjuvanted synthetic lipopeptide vaccine. *Vaccine*, 14: 923-929.
- Fries, L. F., et al. (1992a) Liposomal malaria vaccine in humans: A safe and potent adjuvant strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 358-362.
- Fries, L. F., et al. (1992b) Safety, immunogenicity, and efficacy of a *Plasmodium falciparum* vaccine comprising a circumsporozoite protein repeat region peptide conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Infect. Immun.*, 60: 1834-1839.
- Glenn, G. M., et al. (1995) Murine IgG subclass antibodies to antigens incorporated in liposomes containing lipid A. *Immunol. Lett.*, 47: 73-78.
- 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).
- Glenn, G. M., Rao, M., Matyas G. R. & Alving, C. R. Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 391, 851 (1998).
- Glenn, G. M., Scharton-Kersten, T., Vassell, R., Matyas, G. & Alving, C. R. Transcutaneous immunization using bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants. *Infect. Immun.* (in the press).
- Goeddel, D. V. (1990) *Gene Expression Technology*, Academic Press, San Diego.
- Gordon, Ada and Alistar Ramsey (1997) *Vaccine, Vaccination and the Immune Response*, Philadelphia, New York: Lipincott-Raven, pp. 13-14.
- Gregoriadis, G. (1993) *Liposome Preparation and Related Techniques*, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton.
- Herrington, D. A., et al. (1991) Safety and immunogenicity of a recombinant sporozoite malaria vaccine against *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45: 695-701.
- Hollingsbee, D. (1995) Use of hydrocolloid patches, In: *Percutaneous Penetration Enhancers* (Eds., Smith, E. and Maibach, H.), CRC Press.
- Idson, B. (1978) Hydration and percutaneous absorption. *Curr. Prob. Dermatol.*, 7:132- 141.
- 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.
- Janeway, C. A., and Travers, P. (1996). *Immunobiology*, Churchill Livingstone, New York.
- Janson, J.-C., and Ryden, L. (1989) *Protein Purification*, VCH, New York.
- Katkov, W. N. (1996) Hepatitis vaccines. *Med. Clin. North Am.*, 80: 189-200.
- Khusmith, S., et al. (1991) Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science*, 252: 715-718.
- Kounnas, M. Z., et al. (1992) The  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *J. Biol. Chem.*, 267: 12420-12423.
- Kriegler, M. (1990) *Gene Transfer and Expression*, Stockton Press, New York.
- Krueger, K. M., and Barbieri, J. T. (1995) The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin. Microbiol.*

Rev., 8: 34-47.

- Lee, A., and Chef, M. (1994) Successful immunization against gastric infection with *Helicobacter* species: Use of a cholera toxin B-subunit-whole-cell vaccine. *Infect. Immun.*, 62: 3594-3597.
- Leung, D. Y. (1997) Atopic dermatitis: Immunobiology and treatment with immune modulators. *Clin. Exp. Immunol.*, 107 (Suppl. 1): 25-30.
- Lieberman, J. M., and Greenberg, D. P. (1996) Hepatitis A and B vaccines in children. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.*, 11: 333-363.
- Malik, A., et al. (1991) Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3300-3304.
- Mast, E. E., and Krawczynski, K. (1996) Hepatitis E: An overview. *Annu. Rev. Med.*, 47: 257-266.
- Mckenzie, A. W., and Stoughton, R. B. (1962) Method for comparing percutaneous absorption of corticosteroids. *Arch. Dermatol.*, 86: 608-610.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A. (1997) Innate immunity: Impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 4-9.
- 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.
- Migliorini, P., et al. (1993) Malaria vaccine: Immunization of mice with a synthetic T cell helper epitope alone leads to protective immunity. *Eur. J. Immunol.*, 23: 582-585.
- Morein, B., and Simons, K. (1985) Subunit vaccines against enveloped viruses: Virosomes, micelles and other protein complexes. *Vaccine*, 3: 83-93.
- 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.
- Murray, E. J. (1991) Gene Transfer and Expression Protocols. Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Nohria, A., and Rubin, R. H. (1994) Cytokines as potential vaccine adjuvants. *Biotherapy*, 7: 261-269.
- Paul, A., and Cevc, G. (1995) Noninvasive administration of protein antigens: Transdermal immunization with bovine serum albumin in transfersomes. *Vaccine Res.*, 3: 145-164.
- Paul, A., et al. (1995) Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *Eur. J. Immunol.*, 25: 3521-3524, 1995.
- Paul, W. E., and Seder, R. A. (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76: 241-251.
- 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.
- 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.
- 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.
- Plotkin, S. A., and Mortimer Jr., E. A. (1994) Vaccines, 2nd Ed., W. B. Saunders, Philadelphia.
- Proksch, E., and Brasch, J. (1996) Integrity of the permeability barrier regulates epidermal Langerhans' cell density. *Br. J. Dermatol.*, 134: 630-638.
- 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.
- Rappuoli, R., et al. (1995) Genetic detoxification of bacterial toxins: A new approach to vaccine development. *Int. Archiv. Allergy Immunol.*, 108: 327-333.
- Rappuoli, R., et al. (1996) New vaccines against bacterial toxins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 397: 55-60.
- Ribi, H. O., et al. (1988) Three-dimensional structure of cholera toxin penetrating a lipid membrane. *Science*, 239: 1272-1276.
- Richards, R. L., et al. (1995) A compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: *Vaccine Design* (Eds., Powell, M. F., and Newman, M. J.), Plenum, New York.
- 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.
- Saloga, J., et al. (1996) Superantigens. *Exp. Dermatol.*, 5: 65-71.
- Saukkonen, K., et al. (1992) Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 118-122.
- Schneerson, R. E., et al. (1996) A toxoid vaccine for pertussis as well as diphtheria? Lessons to be relearned. *Lancet* 348: 1289-1292.
- Scopes, R. K. (1993) Protein Purification, Springer-Verlag, New York.
- Seder, R. A., and Paul, W. E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 635-673.
- Shafara, A., et al. (1995) Hepatitis C. *Ann. Intern. Med.*, 125: 658-668.
- 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.

- Smedile, A., et al. (1994) Advances in hepatitis D virus biology and disease. *Prog. Liver Dis.*, 12: 157-175.
- 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.
- Sniderman, D. P. (1995) The mucosal adjuvant activities of ADP-ribosylating bacterial enterotoxins. *Crit. Rev. Immunol.*, 15: 317-348.
- Spangler, B. D. (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.*, 56: 622-647.
- Stacey, K. J., et al. (1996) Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.*, 157: 2116-2122.
- Stingl, G., et al. (1989) The immune functions of epidermal cells. *Immunol. Ser.*, 46: 3-42.
- 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.
- 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.
- Tam, J. P. (1988) Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a highdensity multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5409-5413.
- Tang, D. C., et al. (1997) Vaccination onto bare skin. *Nature*, 388: 729-730.
- Tew, J. G., et al. (1997) Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol. Rev.*, 156: 39-52.
- Trach, D. D., et al. (1997) Field trial of a locally produced, killed, oral cholera vaccine in Vietnam. *Lancet*, 349: 231-235.
- 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.
- 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.
- Vreden, S. G. S., et al. (1991) Phase I clinical trial of a recombinant malaria Vaccine consisting of the circumsporozoite repeat region of *Plasmodium falciparum* coupled to hepatitis B surface antigen, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45: 533-538.
- Wang, R., et al. (1995) Induction of protective polyclonal antibodies by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein multiple antigen peptide vaccine. *J. Immunol.*, 154: 2784-2793.
- White, K., et al. (1993) Induction of cytolytic and antibody responses using *Plasmodium falciparum* repeatless circumsporozoite protein encapsulated in liposomes. *Vaccine*, 11: 1341-1346.
- 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.
- Wisdom, G. B. (1994) *Peptide Antigens*, IRL Press, Oxford.
- 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 Adjuvans; und einem pharmazeutisch akzeptablen Träger für die Herstellung einer Formulierung zur transkutanen Immunisierung durch Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort in einem Probanden; wobei die Formulierung in einer therapeutisch wirksamen Menge auf eine vorbehandelte Fläche auf die Haut des Probanden aufgetragen wird, die nicht perforiert ist, und die Vorbehandlung mindestens das Stratum corneum der Haut auftraut; und wobei das Antigen zumindest teilweise gereinigt wird und aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Kohlenhydrat, Glycolipid, Glycoprotein, Lipid, Lipoprotein, Phospholipid und Polypeptid besteht.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Vorbehandlung das Eindringen der Formulierung durch die Haut steigert.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Träger ein Verbandsstoff ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei der Verbandsstoff aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem abdeckenden Verband, einem nicht-abdeckenden Verband, einem Hydrogel-Verband und einem Reservoir-Verband besteht.

5. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Vorbehandlung das Abwischen der vorbehandelten Fläche mit einem Tupfer umfasst.
6. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Vorbehandlung das Auftragen eines Mittels umfasst, welches das Eindringen der Formulierung durch die Haut steigert.
7. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, welche 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 grenzflächenaktives Mittel oder eine Lösung eines grenzflächenaktiven Mittels enthält.
11. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Vorbehandlung das Auftragen einer Enthaarungs-Formulierung und das Belassen dieser Formulierung auf der vorbehandelten Fläche für einen Zeitraum von 0,1-30 Minuten umfasst.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der Zeitraum 4-20 Minuten beträgt.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei der Zeitraum etwa 12 Minuten beträgt.
14. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Vorbehandlung das Auftragen einer keratinolytischen Formulierung und das Belassen dieser Formulierung auf der vorbehandelten Fläche für einen Zeitraum von 0,1-30 Minuten umfasst.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die keratinolytische Formulierung ein Salicylat darstellt.
16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei der Zeitraum 4-20 Minuten beträgt.
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei dieser Zeitraum etwa 10 Minuten beträgt.
18. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Vorbehandlung das Aufrauen der Oberflächenschicht der vorbehandelten Fläche mit einer Vorrichtung zum Aufrauen umfasst.
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die Vorrichtung zum Aufrauen aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einer Feile, einem Scheuerkissen, einer Tuberkulin Testvorrichtung mit Zacken, aus einer mit Gas betriebenen Pistole, einer Gen-Kanone, einer Treibmittel-Vorrichtung, einer Mikronadel-Vorrichtung und einem klebenden Band besteht.
20. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die therapeutisch wirksame Immunantwort zu einer Vermehrung der Lymphknoten-Zellen führt.
21. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei ein einzelnes Molekül dieser Formulierung sowohl Antigen- als auch Adjuvans-Eigenschaften aufweist.
22. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, welche darüber hinaus die Verabreichung einer gesonderten Antigen-Formulierung an den Probanden umfasst.
23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die gesonderte Antigen-Formulierung zu einer Zeit verabreicht wird, nachdem die Formulierung auf die vorbehandelte Fläche aufgetragen wurde, wobei die gesonderte Antigen-Formulierung eine weitere Immunantwort in dem Probanden bereitstellt.
24. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die gesonderte Antigen-Formulierung zu einer Zeit verabreicht wird, ehe die Formulierung auf die vorbehandelte Fläche aufgetragen wird, wobei die gesonderte Antigen-Formulierung eine weitere Immunantwort in dem Probanden bereitstellt.

25. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die Auftragung der Formulierung, welche ein Adjuvans enthält, und die Verabreichung der gesonderten Antigen-Formulierung gleichzeitig erfolgen.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 22 bis 25, wobei die gesonderte Antigen-Formulierung durch intramuskuläre Injektion oder auf einem Weg verabreicht wird, der aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einer oralen, nasalen, bukkalen, rektalen, vaginalen und intradermalen Verabreichung besteht.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 22 bis 26, wobei die gesonderte Antigen-Formulierung parenteral verabreicht wird.

28. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Antigen ein mindestens teilweise gereinigtes proteinartiges Antigen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1.000 Dalton darstellt.

29. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei sich das Antigen auf der Zelloberfläche einer Langerhans-Zelle einem Lymphozyten präsentiert, und dadurch die Immunantwort in dem Organismus auslöst.

30. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Ausgesetztsein gegenüber dem Adjuvans die Wanderung der Langerhans-Zelle zu einem Lymphknoten verursacht.

31. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Ausgesetztsein gegenüber dem Adjuvans der Langerhans-Zelle signalisiert, zu einer dendritischen Zelle zu reifen.

32. Verwendung nach Anspruch 30 oder 31, welche darüber hinaus die Aktivierung der Langerhans-Zelle umfasst, um die Expression der durch den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex kodierten Klasse II-Moleküle zu steigern.

33. Verwendung nach Anspruch 30, 31 oder 32, wobei das Adjuvans die Langerhans-Zellen aktiviert.

34. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt wird und aus einer Quelle stammt, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus einem Pathogen, einer Tumorzelle oder einer normalen Zelle besteht.

35. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt wird und von einem Pathogen stammt, das aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus einem Bakterium, Virus, Pilz und einem Parasiten besteht.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 34, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt wird und aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Tumor-Antigen, einem Auto-Antigen, einem Allergen und einem Mittel zur biologischen Kriegsführung besteht.

37. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Antigen multivalent ist.

38. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Adjuvans die Präsentation des Antigens gegenüber einem Lymphozyten steigert.

39. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Adjuvans ein molekulares Muster darstellt, das mit einem Pathogen in Beziehung steht (pathogen-associated molecular pattern; PAMP).

40. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 38, wobei das Adjuvans eine Nukleinsäure darstellt, die bakterielle DNA oder nicht-methylierte CpG-Motive umfasst.

41. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 38, wobei das Adjuvans ein Lipopolysaccharid oder ein Derivat desselben darstellt.

42. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 38, wobei das Adjuvans ein Cytokin oder ein Chemokin darstellt.

43. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 38, wobei das Adjuvans ein genetisch verändertes oder ein chemisch konjugiertes Toxin darstellt.

44. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Adjuvans in der Formulierung als eine Nukleinsäure bereitgestellt wird, die eine Sequenz umfasst, welche für ein Adjuvans kodiert.

45. Verwendung nach Anspruch 44, wobei die Nukleinsäure nicht integrierend und nicht infektiös ist.

46. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Formulierung eine Creme, Emulsion, Gel, Lotion, Salbe, Paste, Lösung oder Suspension darstellt.

47. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Formulierung auf die unversehrte Haut aufgetragen wird und mehr als einen Bereich von ableitenden Lymphknoten bedeckt.

48. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Immunisierung der Behandlung einer Krankheit des Probanden dient.

49. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Immunisierung der Vorbeugung einer Krankheit des Probanden dient.

50. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Immunisierung der Behandlung einer Krankheit des Probanden dient, die durch das Ausgesetztsein gegenüber dem Antigen verursacht wurde.

51. Artikel für die transkutane Immunisierung, der umfasst: (i) eine Formulierung, die mindestens ein Antigen und mindestens ein Adjuvans umfasst; (ii) einen Verband, der in der Lage ist, zu haften; und (iii) einen Verstärker bezüglich des Eindringens durch die Haut; wobei der Artikel dafür vorgesehen ist, die Formulierung auf die Haut des Probanden unter dem Verband aufzutragen, und der Verstärker bezüglich des Eindringens durch die Haut so beschaffen ist, dass er mindestens das Stratum corneum der Haut ohne Perforation aufraut, und wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Kohlenhydrat, Glycolipid, Glycoprotein, Lipid, Lipoprotein, Phospholipid und Polypeptid besteht.

52. Artikel nach Anspruch 51, wobei der Verstärker bezüglich des Eindringens durch die Haut aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Alkohol, Aceton, einem grenzflächenaktiven Mittel, einem enthaarten Mittel und einem keratinolytischen Mittel besteht.

53. Artikel nach Anspruch 52, wobei der Verstärker bezüglich des Eindringens durch die Haut Alkohol oder Aceton darstellt und mit einem Tupfer kombiniert wird.

54. Artikel nach Anspruch 51, 52 oder 53, wobei das Adjuvans ein molekulares Muster darstellt, das mit einem Pathogen in Beziehung steht (PAMP).

55. Artikel nach Anspruch 51, 52 oder 53, wobei das Adjuvans eine Nukleinsäure darstellt, die eine bakterielle DNA oder nicht-methylierte CpG-Motive umfasst.

56. Artikel nach Anspruch 51, 52 oder 53, wobei das Adjuvans ein Lipopolysaccharid oder ein Derivat desselben darstellt.

57. Artikel nach Anspruch 51, 52 oder 53, wobei das Adjuvans ein Cytokin oder ein Chemokin darstellt.

58. Artikel nach Anspruch 51, 52 oder 53, wobei das Adjuvans ein genetisch verändertes oder ein chemisch konjugiertes Toxin darstellt.

59. Artikel nach einem der Ansprüche 51 bis 58, wobei ein einzelnes Molekül der Formulierung sowohl Antigen- als auch Adjuvans-Eigenschaften aufweist.

60. Artikel nach einem der Ansprüche 51 bis 59, wobei das Antigen ein mindestens teilweise gereinigtes, proteinartiges Antigen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1.000 Dalton darstellt.

61. Artikel nach einem der Ansprüche 51 bis 59, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus einer Quelle stammt, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus einem Pathogen, einer Tumorzelle und einer normalen Zelle besteht.

62. Artikel nach einem der Ansprüche 51 bis 59, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und

von einem Pathogen stammt, das aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus einem Bakterium, Virus, Pilz und einem Parasiten besteht.

63. Artikel nach einem der Ansprüche 51 bis 59, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Tumor-Antigen, einem Auto-Antigen, einem Allergen und einem Mittel zur biologischen Kriegsführung besteht.

64. Vorrichtung zum Auftragen einer Schicht mit einer Vielzahl von Zacken für die transkutane Immunisierung, wobei die Zacken mit einer Formulierung beschichtet sind, die mindestens ein Antigen und mindestens ein Adjuvans enthält; und wobei die Zacken so gestaltet sind, um mindestens das Stratum corneum der Haut des Probanden aufzurauen, ohne die Haut des Probanden zu perforieren; und wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Kohlenhydrat, Glycolipid, Glycoprotein, Lipid, Lipoprotein, Phospholipid und Polypeptid besteht.

65. Vorrichtung nach Anspruch 64, wobei das Adjuvans ein molekulares Muster darstellt, das mit einem Pathogen in Beziehung steht (PAMP).

66. Vorrichtung nach Anspruch 64, wobei das Adjuvans eine Nukleinsäure darstellt, die eine bakterielle DNA oder nicht-methylierte CpG-Motive umfasst.

67. Vorrichtung nach Anspruch 64, wobei das Adjuvans ein Lipopolysaccharid oder ein Derivat desselben darstellt.

68. Vorrichtung nach Anspruch 64, wobei das Adjuvans ein Cytokin oder ein Chemokin darstellt.

69. Vorrichtung nach Anspruch 64, wobei das Adjuvans ein genetisch verändertes oder ein chemisch konjugiertes Toxin darstellt.

70. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 65 bis 69, wobei ein einzelnes Molekül der Formulierung sowohl Antigen- als auch Adjuvans-Eigenschaften aufweist.

71. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 65 bis 70, wobei das Antigen ein mindestens teilweise gereinigtes, proteinartiges Antigen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1.000 Dalton darstellt.

72. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 65 bis 71, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und von einer Quelle stammt, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus einem Pathogen, einer Tumorzelle und einer normalen Zelle besteht.

73. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 65 bis 72, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus einem Pathogen stammt, das aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus einem Bakterium, Virus, Pilz und einem Parasiten besteht.

74. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 65 bis 73, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus einem Tumor-Antigen, einem Auto-Antigen, einem Allergen und einem Mittel zur biologischen Kriegsführung besteht.

75. Treibmittel-Vorrichtung für die transkutane Immunisierung, wie zum Beispiel eine Kanone, wobei die Vorrichtung eine Formulierung umfasst, die mindestens ein Antigen und mindestens ein Adjuvans enthält; und wobei die Vorrichtung so gestaltet wurde, um die Formulierung durch Eindringen in die Epidermis oder in die oberflächliche Dermis der Haut des Probanden zu verabreichen, nicht jedoch die Dermis zu durchdringen; und wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Kohlenhydrat, Glycolipid, Glycoprotein, Lipid, Lipoprotein, Phospholipid und Polypeptid besteht.

76. Vorrichtung nach Anspruch 75, wobei das Adjuvans ein molekulares Muster ist, das mit einem Pathogen in Beziehung steht (PAMP).

77. Vorrichtung nach Anspruch 75, wobei das Adjuvans eine Nukleinsäure darstellt, die eine bakterielle DNA oder nicht-methylierte CpG-Motive umfasst.

78. Vorrichtung nach Anspruch 75, wobei das Adjuvans ein Lipopolysaccharid oder ein Derivat desselben

darstellt.

79. Vorrichtung nach Anspruch 75, wobei das Adjuvans ein Cytokin oder ein Chemokin darstellt.

80. Vorrichtung nach Anspruch 75, wobei das Adjuvans ein genetisch verändertes oder ein chemisch konjugiertes Toxin darstellt.

81. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 75 bis 80, wobei ein einzelnes Molekül der Formulierung sowohl Antigen- als auch Adjuvans-Eigenschaften aufweist.

82. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 75 bis 81, wobei das Antigen ein mindestens teilweise gereinigtes, proteinartiges Antigen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1.000 Dalton darstellt.

83. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 76 bis 82, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus einer Quelle stammt, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus einem Pathogen, einer Tumorzelle und einer normalen Zelle besteht.

84. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 76 bis 83, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und von einem Pathogen stammt, das aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus einem Bakterium, Virus, Pilz und einem Parasiten besteht.

85. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 76 bis 84, wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Tumor-Antigen, einem Auto-Antigen, einem Allergen oder einem Mittel zur biologischen Kriegsführung besteht.

86. Kit für die transkutane Immunisierung, der folgendes umfasst:  
mindestens ein Antigen und mindestens ein Adjuvans in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger; und mindestens einen Verstärker bezüglich des Eindringens durch die Haut oder eine Vorrichtung zum Aufrauen der Hautschichten, wobei der Verstärker bezüglich des Eindringens durch die Haut oder die Vorrichtung zum Aufrauen der Hautschichten so eingestellt sind, um mindestens das Stratum corneum der Haut des Probanden aufzurauen, ohne die Haut des Probanden zu perforieren, um eine Immunantwort auszulösen, die für das Antigen spezifisch ist; wobei das Antigen mindestens teilweise gereinigt ist und aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Kohlenhydrat, Glycolipid, Glycoprotein, Lipid, Lipoprotein, Phospholipid und Polypeptid besteht.

87. Kit nach Anspruch 86, wobei der Verstärker bezüglich des Eindringens durch die Haut aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Alkohol, Aceton, einem grenzflächenaktiven Mittel, einem enthaarenden Mittel und aus einem keratinolytischen Mittel besteht.

88. Kit nach Anspruch 86 oder 87, wobei die Vorrichtung zum Aufrauen aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einer Feile, einem Scheuerkissen, einer Tuberculin-Testvorrichtung mit Zacken; einer mit Gas betriebenen Pistole, einer Gen-Kanone, einer Treibmittel-Vorrichtung, einer Mikronadel-Vorrichtung und einem Klebeband besteht.

89. Kit nach Anspruch 86, 87 oder 88, wobei ein einzelnes Molekül sowohl Antigen- als auch Adjuvans-Eigenschaften aufweist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

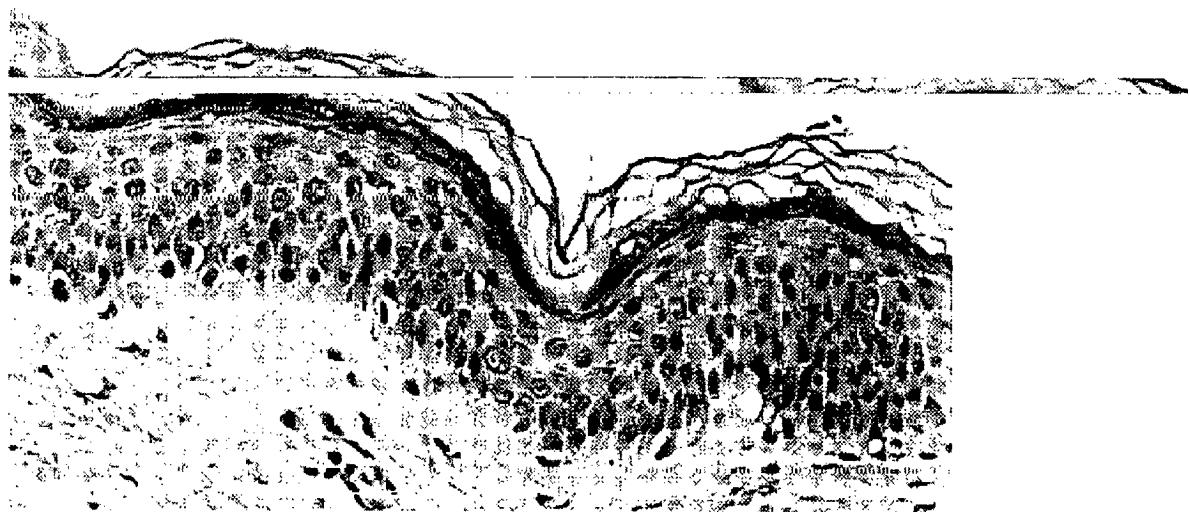
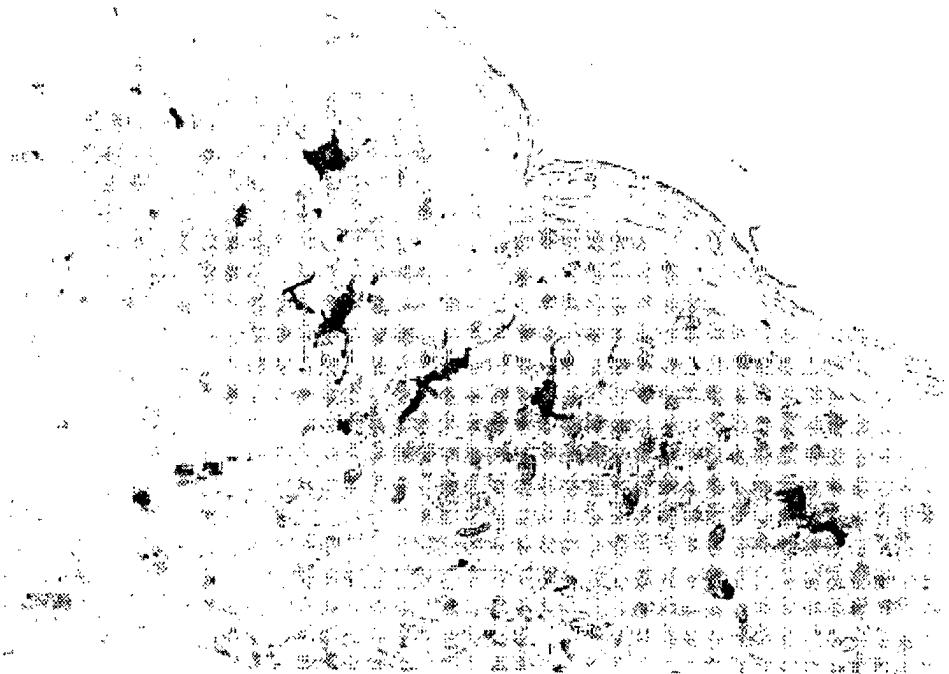


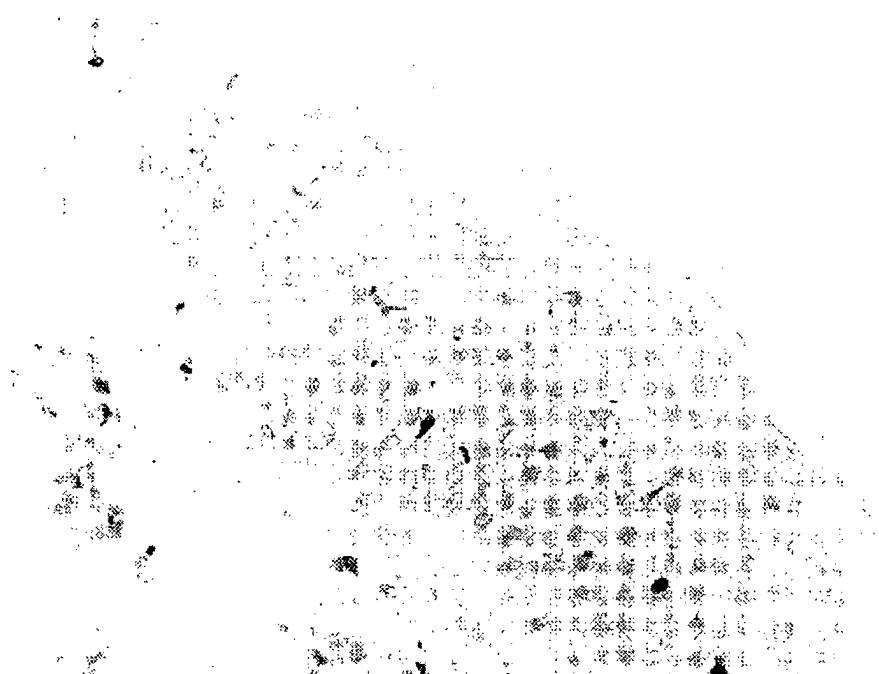
FIG. 1A



FIG. 1B



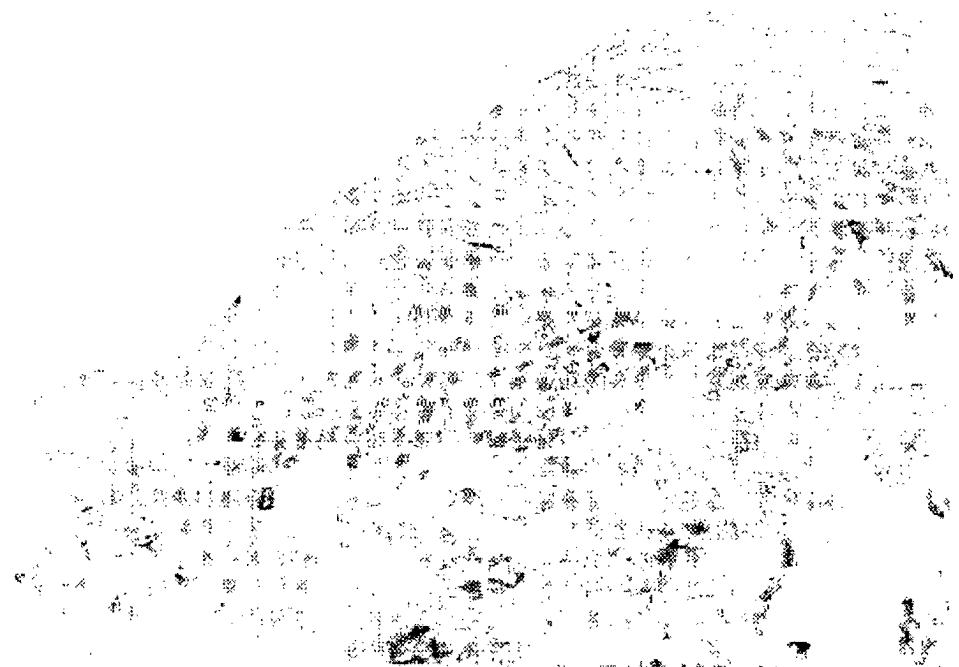
**FIG. 1C**



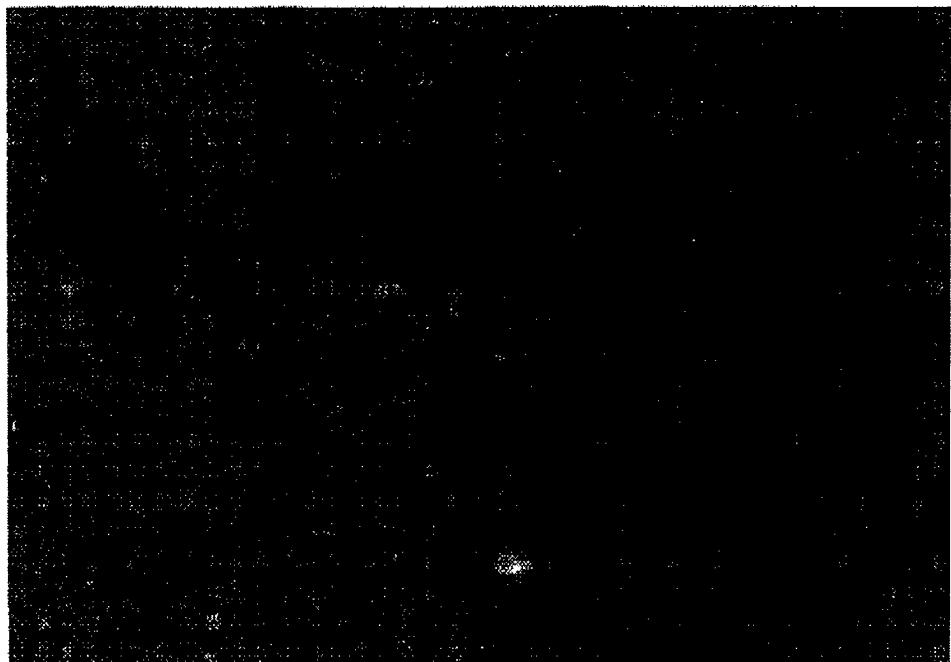
**FIG. 1D**



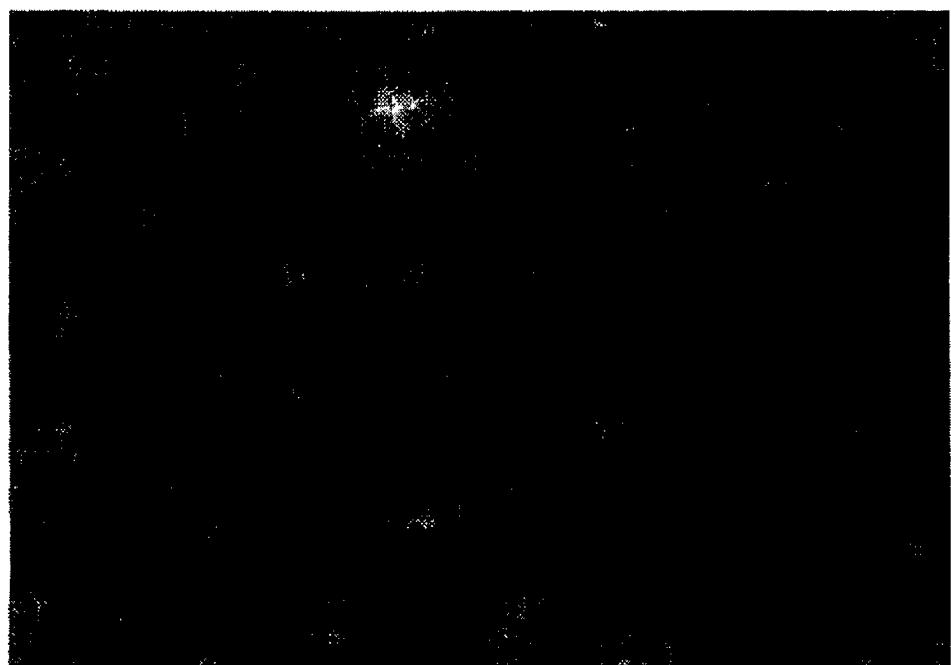
**FIG. 1E**



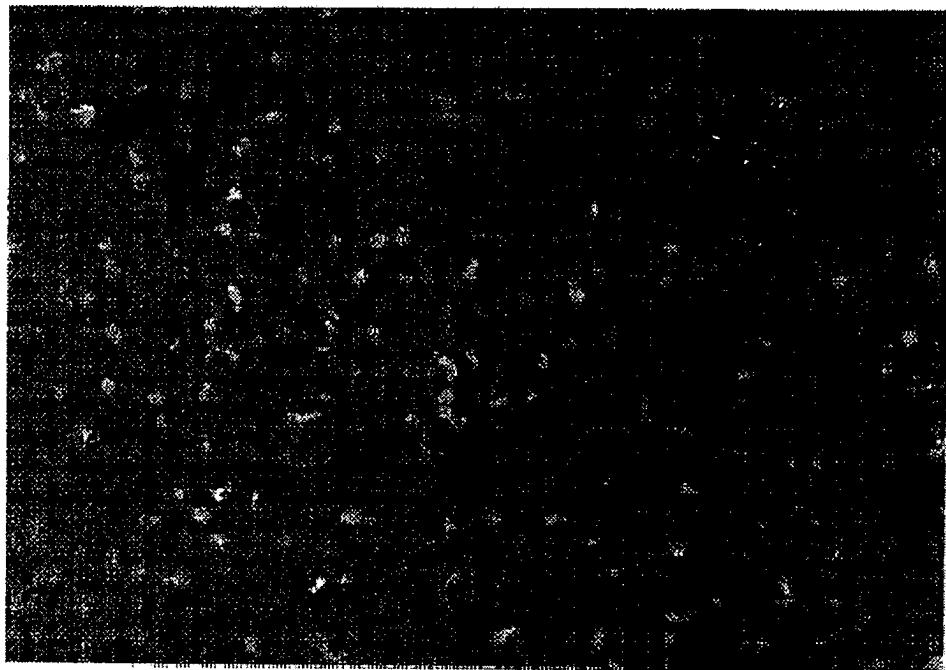
**FIG. 1F**



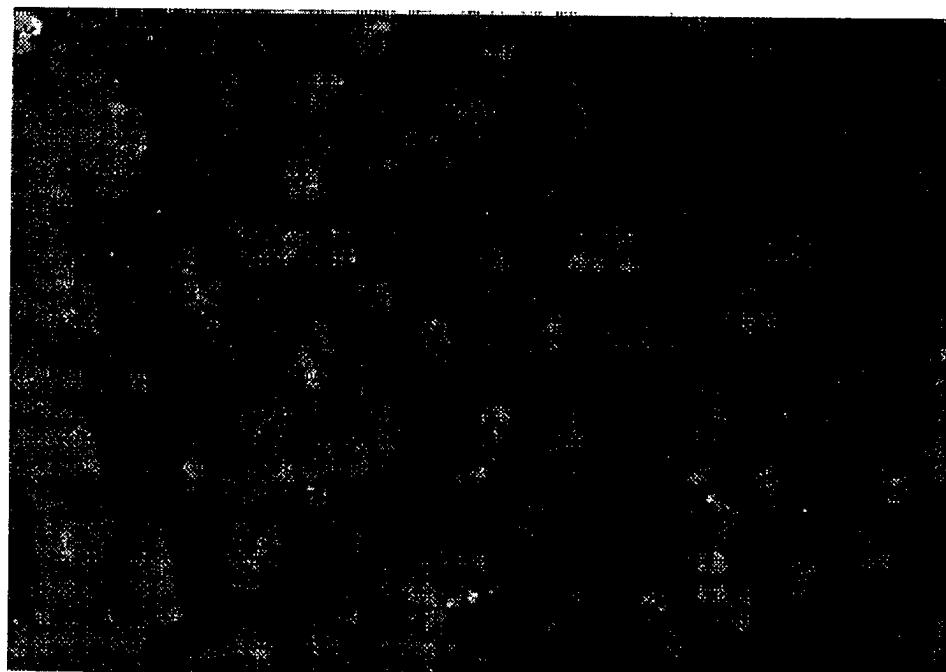
**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 2C**



**FIG. 2D**