



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 283 053**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 31/12 (2006.01)
A61K 31/125 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **98918392 .6**
⑧6 Fecha de presentación : **20.04.1998**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1071411**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2001**

⑤4 Título: **Inmunoestimulación tópica para inducir la migración celular de Langerhans.**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

⑦3 Titular/es: **TORREY PINES INSTITUTE FOR
MOLECULAR STUDIES
3550 General Atomics Court, Bldg. 2, Room 138
San Diego, California 92121, US**

⑦2 Inventor/es: **Cowing, Carol, O.**

⑦4 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Imunoestimulación tópica para inducir la migración celular de Langerhans.

5 Antecedentes de la invención

La primera línea de defensa del cuerpo contra patógenos es la piel. La capa más externa, el estrato córneo, es una zona ancha de 20 a 30 capas de células de espesor. Las células muertas restantes que comprenden el estrato córneo están casi completamente rellenas de fibrillas de queratina y rodeadas por bicapas lipídicas altamente ordenadas. Siempre que la epidermis no esté rota, el estrato córneo densamente queratinizado presenta una barrera física formidable para la entrada de la mayoría de sustancias foráneas. Las membranas mucosas que recubren los tractos digestivo, respiratorio, urinario y reproductivo, proporcionan una barrera física similar, pero menos formidable, careciendo del estrato córneo grueso.

Las capas subyacentes del epitelio tanto en la piel como en las membranas mucosas están altamente pobladas con células dendríticas inmaduras, denominadas células de Langerhans. Estos leucocitos fagocíticos están listos para la captura de antígenos que pueden entrar en los estratos inferiores de la epidermis a través de brechas físicas en el estrato córneo. Después de un trauma físico en la piel, se generan señales que inducen a las células de Langerhans a dejar el epitelio y migrar a través de los nodos linfáticos aferentes a los nodos de linfa, llevando consigo cualquier antígeno que hubiera penetrado el estrato córneo protector (es decir, vírico, bacteriano, parasítico, alergénico). Pueden penetrar en el estrato córneo intacto moléculas lipofílicas, muy pequeñas, y algunas moléculas altamente reactivas conocidas como agentes sensibilizadores de la piel, tales como TNCB, catecol de hiedra venenosa, oxazolona, etc., uniéndose posteriormente a las proteínas de la epidermis subyacente y activando las células de Langerhans.

Los antígenos de proteína capturados se interiorizan y se degradan mediante las células de Langerhans para proporcionar péptidos pequeños que se incorporan en los surcos de unión de proteína de moléculas MHC. Los complejos MHC-péptido se insertan a continuación en las membranas de plasma para la presentación a los receptores de células T. Durante su migración a los nodos de linfa, las células de Langerhans se diferencian en células dendríticas linfoides maduras, perdiendo sus propiedades fagocíticas y en su lugar, expresando niveles elevados de moléculas MHC de clase I y II además de moléculas coestimuladoras y de adhesión, esenciales para la presentación del antígeno eficaz (Udey, *Clin. Exp. Immunol.* 107:6-8, 1997). Aunque en la actualidad es bien conocido que las células de Langerhans migran desde el epitelio a las áreas de las células T de los nodos de linfa drenantes, se conoce relativamente poco sobre las señales que inducen la migración y la diferenciación de las células de Langerhans. En cualquier caso, una vez en los nodos de linfa, las células de Langerhans diferenciadas que contienen los complejos de MHC-péptido activan principalmente las células T auxiliares CD4+ y las células T citotóxicas CD8+. Estas células de Langerhans diferenciadas nuevamente que son recientes inmigrantes a los nodos de linfa son los inductores más potentes de la inmunidad de células T que se conoce.

Recientemente se ha demostrado que las células dendríticas de ratón o de humano expuestas a antígenos o péptidos de tumor son inductores eficaces de la inmunidad específica de tumor que pueden eliminar o incluso suprimir tumores establecidos (Young e Inaba, *J. Exp. Med.* 183:7-11, 1996; Zitvogel *et al.*, *J. Exp. Med.* 183:87-97, 1996; Celluzzi *et al.*, *J. Exp. Med.* 183:283-287, 1996; y Paglia *et al.*, *J. Exp. Med.* 183:317-322, 1996). En estos estudios, se cultivaron las células dendríticas de médula de hueso o sangre, se expandieron en un tejido de cultivo, se expusieron a antígenos de tumor *in vitro*, y se reinyectaron finalmente i.v. en el donador. Tal terapia individualizada es necesaria en una población criada fuera para asegurar que las moléculas MHC singeneicas apropiadas se utilizan para células T y células tumorales objetivo del individuo. Aunque elevadamente eficaz, este procedimiento individualizado es demasiado engorroso, consume mucho tiempo y resulta caro para ser una medida terapéutica de amplia aplicación.

Sumario de la invención

Se describe un procedimiento de vacunación tópica para intensificar una respuesta inmune contra un antígeno. Los antígenos de tumores, patógenos víricos y bacterianos, además de parásitos están comprendidos dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento implica la administración del antígeno junto con: 1) un medio para intensificar la penetración del antígeno a través de la piel o de membranas mucosas, y 2) un agente para inducir la migración de las células de Langerhans a los nodos de linfa. El antígeno es preferentemente un péptido de 3-20 residuos de aminoácidos de longitud, y más preferentemente, el péptido contiene 8-14 residuos de aminoácidos. El antígeno se administra preferentemente a una concentración que está en el intervalo de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 100 mg/ml .

Los medios para intensificar la penetración del antígeno incluyen, la utilización de un vehículo lipofílico o un intensificador de penetración, tal como el sulfóxido de dimetilo (DMSO) o azona, ultrasonido de baja frecuencia, electroporación, iontoforesis, administración intraepidérmica y combinaciones de los mismos. Preferentemente, la penetración del péptido en el estrato córneo se facilita con sulfóxido de dimetilo en combinación con uno de los medios de administración transdérmica física.

Los agentes que inducen la migración de las células de Langerhans se seleccionan de entre el grupo constituido por ftalato de dibutilo, D-tartrato de dibutilo, N,N-dietil-toluamida, fumarato de dibutilo, fumarato de di(2-etilhexilo), maleato de diisooctilo, maleato de dietilhexilo, fumarato de diisooctilo, ácido benzoico, cloruro de benzalconio, alcanfor,

maleato de bihenilo, ftalato de dioctilo, maleato de dibutilo, maleato de dioctilo, succinato de dibutilo, succinato de dioctilo, ftalato de dinonilo, ftalato de diisononilo, ftalato de dimetilo, ftalato de dietilo, ftalato de dipropilo, ftalato de difenilo, ftalato de dibencilbutilo y ftalato de dietilmetilo. El ultrasonido de baja frecuencia se puede utilizar asimismo como un inductor de la migración de las células de Langerhans. Preferentemente, se administra ftalato de dibutilo para inducir la migración de las células de Langerhans.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra el efecto de los diversos regímenes de tratamiento sobre las células dendríticas linfoides totales y FITC+ después de dos días de tratamiento.

La figura 2 muestra la cinética de la migración de las células de Langerhans en respuesta a FITC en acetona y en ftalato de dibutilo.

La figura 3 muestra el efecto de la administración tópica de FITC en acetona y en ftalato de dibutilo sobre el número total de células dendríticas del nodo de linfa.

La figura 4 muestra la inhibición pobre del crecimiento del tumor EG7-OVA mediante la administración tópica cutánea del péptido de tumor SIINFEKL en acetona y en ftalato de dibutilo.

La figura 5 ilustra la inducción de la inmunidad específica de tumor EG7-OVA completa mediante la aplicación tópica intravaginal de SIINFEKL en acetona y en ftalato de dibutilo.

La figura 6 muestra la inhibición del crecimiento del tumor EG7-OVA completa mediante la administración tópica cutánea de SIINFEKL en DMSO, seguida de ftalato de dibutilo en acetona.

La figura 7 muestra el efecto de inductores potenciales diversos de la migración de las células de Langerhans en el ensayo de selección de FITC.

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, se administra tópicamente un antígeno para la absorción por las células de Langerhans propias del individuo. Se prefiere incluir un disolvente lipofílico para facilitar la penetración del antígeno a través del estrato córneo y de la epidermis subyacente. En una forma de realización de la presente invención, un estímulo físico, tal como un ultrasonido de baja frecuencia o un campo eléctrico, se puede aplicar a la piel siguiendo la administración tópica, para intensificar la penetración del antígeno a través del estrato córneo. La administración del antígeno a la piel se acompaña de la aplicación tópica de un(os) agente(s) adicional(es), tal como el ftalato de dibutilo, que induce la migración de las células de Langerhans al nodo de linfa drenante.

Inducción de la migración de las células de Langerhans mediante ftalato de dibutilo

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) se ha utilizado ampliamente por el presente inventor y por otros, para caracterizar la migración de las células de Langerhans. El FITC es una molécula lipofílica mayor, no peptídica, pequeña (peso molecular 389), capaz de cruzar el estrato córneo. La inmunogenicidad de FITC se debe a la reactividad de su grupo isotiocianato (-N-C-S) con los grupos amino libres, permitiendo que se una covalentemente a las proteínas y/o péptidos. Los ratones C57BL/6 recibieron los tratamientos siguientes: 1) ninguno; 2) sólo afeitado del abdomen; 3) administración tópica de FITC en acetona; 4) administración tópica de FITC en acetona y en aceite de oliva; 5) administración tópica de FITC en acetona y en DMSO diluido en salino regulado por fosfato (PBS); y 6) administración tópica de FITC en acetona y en ftalato de dibutilo. A continuación se examinaron cada día los nodos de linfa inguinales drenantes para las células de Langerhans inmigrantes mediante inmunofluorescencia por citometría de flujo. Se identificaron las células de Langerhans migratorias por la presencia de FITC y por la expresión de moléculas MHC de clase II elevadas o por anticuerpos monoclonales específicos de células de Langerhans (NLDC-145). Se podrían diferenciar asimismo otras células dendríticas residentes de los nodos de linfa utilizando un anticuerpo monoclonal específico de célula dendrítica, 33D1. Se observaron la absorción de FITC y la respuesta de las células de Langerhans a las señales migratorias en el nodo de linfa drenante tan pronto como a las seis horas después de la administración tópica. Sin embargo, se requirieron 48-72 horas para una velocidad de inmigración máxima en el nodo de linfa. La figura 1 ilustra el efecto de regímenes de tratamiento diversos sobre las células dendríticas linfoides FITC + y totales 2 días después del tratamiento. En animales a los que se administró FITC en acetona, no se produjo intensificación en el número de células de Langerhans FITC+ inducidas por aceite de oliva o por sulfóxido de dimetilo (DMSO), aunque el DMSO tuvo un modesto efecto estimulador sobre la inmigración no específica, sugiriendo que el contacto del antígeno y la migración de las células de Langerhans se regulan independientemente. La adición de ftalato de dibutilo tuvo un efecto impresionante tanto sobre la migración de células dendríticas FITC + como en el total en el nodo de linfa. De esta manera, el ftalato de dibutilo fue un inductor de migración muy potente.

En ratones tratados con FITC en acetona y en ftalato de dibutilo, la cinética de la migración de las células de Langerhans se muestra en la figura 2. Estuvo presente un elevado número de células de Langerhans FITC+ en el nodo de

linfa durante 12 horas y la frecuencia de pico de células de Langerhans FITC+ inmigrantes ocurrió aproximadamente de 2 a 3 días después de la administración tópica. Se observa, sin embargo, que además de inducir la migración de células de Langerhans FITC+, el número de células dendríticas sin marcar se incrementó asimismo notablemente, alcanzando niveles de pico 9-10 días después del tratamiento. Las células dendríticas sin marcar eran lo más probable células de Langerhans que habían perdido la marca FITC. Las células de nodo de linfa totales en respuesta a la administración tópica se muestran en la figura 3. Cinco días después de la pintura de la piel, la población celular de nodo de linfa se había incrementado aproximadamente en 7,2 veces sobre los niveles de la línea de base. Estos resultados indican que el antígeno (FITC) en acetona y en ftalato de dibutilo no solo estimuló la migración celular de Langerhans antígeno +, sino que resultó además en una respuesta espectacular de células T y B en el nodo de linfa drenante.

Inducción de la inmunidad específica de tumor mediada por las células de Langerhans

La línea celular de tumor de timoma C57BL/6, EL4, se transfectó con el gen completo de ovoalbúmina de pollo (OVA). La línea celular transfectada resultante, EG7-OVA, expresa la ovoalbúmina de pollo. Un péptido de ocho aminoácidos, OVA 257-264, con la secuencia, SIINFEKL, se expresa en la molécula K^b MHC de clase I, en la que se ha demostrado que funciona como un antígeno de péptido asociado a un tumor para CD8+CTL tanto *in vivo* como *in vitro* (Celluzzi *et al.*, *J. Exp. Med* 183:283 (1996)). Basándose en los resultados positivos utilizando FITC, los presentes inventores siguieron un protocolo similar en un intento para inducir la inmunidad del tumor EG7-OVA mediante la administración tópica del péptido, asociado a tumor SIINFEKL sintético, bien caracterizado.

Los ratones C57BU6 se trataron como sigue: 1) solo afeitado; 2) administración tópica de acetona y de ftalato de dibutilo; 3) SIINFEKL (240:g/ml) en DMSO diluido en PBS, seguido de 5 horas en acetona y en ftalato de dibutilo; y 4) SIINFEKL (240:g/ml) en acetona y en ftalato de dibutilo. Posteriormente, se inyectaron a todos los ratones subcutáneamente 5×10^5 de células EG7-OVA (5 veces la dosis tumorigénica mínima). La inmunidad específica de tumor se monitorizó midiendo el tamaño del tumor. Los resultados que se muestran en la figura 4, indican que ninguno de los protocolos de tratamiento fue eficaz en la inhibición del crecimiento de las células de tumor. Desde que se conoció a partir de los experimentos de FITC que el ftalato de dibutilo era un potente inductor de migración de las células de Langerhans y que el SIINFEKL se incorporaba fácilmente en la molécula K^b MHC de clase I en la que se activaban CD8+ CTL (Celluzzi *et al.*, *J. Exp. Med.* 183:283 (1996)), se concluyó que el péptido SIINFEKL no consiguió atravesar el estrato córneo.

Desde que se postuló que la administración tópica de SIINFEKL en acetona y en ftalato de dibutilo fallaba en conferir la inmunidad específica de tumor porque el péptido no penetró en el estrato córneo, se aplicó intravaginalmente la misma vacuna tópica. Las membranas mucosas carecen de la barrera resistente colocada por el estrato córneo. Los resultados que se muestran en la figura 5 sugirieron que la protección completa contra el tumor se indujo mediante SIINFEKL en acetona y en ftalato de dibutilo. La línea celular madre de tumor EL4, carecedora de ovoalbúmina de pollo, se utilizó como control positivo; no se observó inmunidad contra las células de tumor EL4. De este modo, se confirmó la hipótesis de los presentes inventores en cuanto a la penetración del estrato córneo; el péptido SIINFEKL no alcanzaba las células de Langerhans subyacentes en el estrato córneo.

Aunque la administración tópica intravaginal del antígeno de tumor proporcionó un medio de recorrido eficaz de antígeno a las células de Langerhans para la posterior inducción de la inmunidad específica de tumor, los sitios de aplicación de membrana mucosa, como la vagina, no son bien adecuados para la utilización y la monitorización convenientes por médicos generales que se involucran probablemente en la administración de vacunas tópicas de la presente invención. De este modo, para intensificar la eficacia de la administración tópica cutánea, se disolvió SIINFEKL en DMSO y se aplicó a la piel sin dilución. Se aplicó ftalato de dibutilo en acetona al mismo sitio 5 horas más tarde. Posteriormente se les inyectó subcutáneamente 5×10^5 de células EG7-OVA a todos los ratones. Los resultados que se muestran en la figura 6, indican que el péptido en DMSO fue capaz de atravesar el estrato córneo, obteniendo eficazmente acceso a las células de Langerhans. El crecimiento de tumor se suprimió después de 6 a 9 días e incluso los tumores establecidos se eliminaron completamente 16 días después de la inoculación. De este modo, el péptido específico de tumor, SIINFEKL, en DMSO concentrado, penetró el estrato córneo, se incorporó en la molécula K^b MHC de clase I sobre las células de Langerhans de la epidermis y en presencia del inductor de migración, ftalato de dibutilo, se presentó eficazmente a CD8+ CTL en los nodos de linfa.

Fuente de antígeno

“Antígeno” tal como se utiliza en la presente memoria, incluye cualquier molécula que cuando se administra según la presente invención es capaz de provocar la inmunidad específica de antígeno. En consecuencia, el antígeno o un fragmento del mismo debe ser capaz de (1) penetrar la piel o la membrana mucosa, (2) interactuar con las células de Langerhans en la epidermis o epitelio de membranas mucosas, (3) asociarse por completo o en parte con una molécula MHC de clase I o II sobre una célula de Langerhans, y (4) activar los receptores de célula T sobre células T CD4+ o CD8+, confiriendo inmunidad específica de antígeno. Más particularmente, el procedimiento de vacunación tópica de la presente invención se dirige hacia los antígenos de células tumorales, patógenos víricos y bacterianos y parásitos.

Se prefieren particularmente antígenos de péptido pequeños, aunque no esenciales, ya que es más fácil que atravesasen péptidos más pequeños (aproximadamente de 3,20 residuos de aminoácidos) a través del estrato córneo y de la

epidermis que proteínas mayores. Además, los péptidos de tamaño adecuado, como SIINFEKL, es más probable que se unan directamente a las moléculas MHC sobre la superficie de la célula de Langerhans a través del procedimiento de intercambio de péptido, en el que los péptidos añadidos exógenamente sustituyen los péptidos endógenos, que pueden mostrar una afinidad inferior para el surco de unión de péptido de las moléculas MHC de clase I o II. Se han estudiado ampliamente las características de péptidos adecuados para la asociación directa con las moléculas MHC de clase I o II. De este modo, los expertos en la materia serían capaces de predecir, basándose en la estructura del péptido, secuencias probables para la asociación con un MHC dado. Los péptidos que se unen eficazmente a las moléculas MHC de clase I comprenden por lo general de aproximadamente 8-9 residuos de aminoácidos, mientras que los péptidos que se asocian preferentemente con las moléculas MHC de clase II tienen una longitud de aproximadamente 11-14 residuos de aminoácidos. De hecho, se conocen algunos péptidos de antígeno capaces de interactuar directamente con las moléculas MHC sobre las células dendríticas y se pueden sintetizar mediante técnicas estándar.

De forma alternativa, aunque los antígenos asociados a tumor específico se han identificado por muchos tumores humanos, a menudo se desconocen los péptidos relevantes. Sin embargo, se pueden preparar rápida y fácilmente los péptidos de tumor eluidos con ácido puro y se ha demostrado que son eficaces inductores de la inmunidad específica de tumor cuando se asocian con células dendríticas (Zitvogel *et al.*, *J. Exp. Med.* 183:87-97, 1996). De este modo, preparaciones homogéneas de péptidos sintéticos, además de mezclas desconocidas de péptidos extraídos, ambas conocidas, pueden ser adecuadas para utilizar en la presente invención. La elección y la preparación de los antígenos de péptido adecuados resultarán evidentes para los expertos en la materia. Ver a continuación para una descripción detallada de los ejemplos de trabajo específicos.

Los compuestos inmunogénicos no peptídicos capaces de inducir la inmunidad específica se contemplan asimismo como antígenos potenciales según la presente invención. Los haptenos no peptídicos pequeños se pueden unir covalentemente a los péptidos o proteínas después de cruzar el estrato córneo, por medio de lo cual obtienen el acceso a rutas de presentación de antígeno estándar, por medio de la asociación con una molécula MHC. Por ejemplo, la inmunogenicidad de FITC se demostró que se debía a la reactividad de su grupo isotiocianato (-N-C-S) con grupos amino libres, permitiendo que se incorpore covalentemente dentro de proteínas y/o péptidos. De esta manera, las mitades antigénicas no peptídicas, de células de tumor, patógenos, parásitos, alérgenos, etc., se pueden utilizar en la práctica de los procedimientos de vacunación tópica de la presente invención.

Se debería apreciar que la elección de la fuente de antígeno no es crítica para la presente invención, siendo un procedimiento general para intensificar la inmunidad específica de antígeno. Sin embargo, la respuesta inmune específica obtenida, dependerá, por supuesto, del antígeno utilizado en particular. Es la forma de la administración tópica, la penetración del estrato córneo, la inducción de la migración celular de Langerhans y la presentación de antígeno posterior mediante rutas dependientes de MHC, lo que individualmente o en combinación, ejemplifica las características de la presente invención. El hecho de que no se impongan limitaciones en la selección de antígenos a partir de una amplia variedad de fuentes es consistente con la utilización de los procedimientos básicos para la inducción de la inmunidad específica de antígenos contra muchos antígenos. De este modo, la elección de un antígeno particular y su fuente dependerá de la aplicación y resultará evidente para los expertos en el campo de la inmunología.

Penetración del estrato córneo

La capa más externa de la piel está concebida para resistir la entrada de materiales foráneos en el cuerpo. Debido a que está formada por capas empaquetadas densamente de membranas celulares de queratinocito y de fibrillas de queratina, el estrato córneo es impermeable a la mayoría de moléculas de masa molecular elevada, particularmente la de naturaleza hidrofílica. En consecuencia, sólo unos pocos fármacos se administran transdérmicamente. Tales moléculas son típicamente pequeñas y lipofílicas. La administración transdérmica de péptidos está mal favorecida a causa de su hidrofiliidad y por lo general de su masa molecular elevada. Numerosos estudios documentan la gran dificultad en pasar péptidos a través del estrato córneo (para revisión, ver Steinstrasser y Merkle, *Pharm. Acta. Helv.* 70:3-24 (1995)). Entre los enfoques que han proporcionado algún éxito en la mejora de la penetración de péptido se incluyen vehículos lipofílicos, ultrasonido de baja frecuencia, electroporación, iontoforesis y administración intraepidérmica. Éstos se consideran a continuación.

Disolventes lipídicos- los disolventes lipídicos como la acetona, la azona y el sulfóxido de dimetilo (DMSO) se sabe que penetran en el estrato córneo. Según se ha descrito anteriormente, el presente inventor ha descubierto que los péptidos pequeños, como SIINFEKL, disuelto en DMSO cruza el estrato córneo y entra en los estratos inferiores de la epidermis. De esta manera, la presente descripción, con respecto a los intensificadores de la penetración de antígeno, comprende una variedad de disolventes lipofílicos, incluyendo DMSO, y sulfuro simétrico o asimétrico y sulfóxidos en los que el grupo alquilo contiene de 1 a 16 átomos de carbono, además de liposomas.

Cuando los penetrantes lipofílicos, tales como el DMSO, se utilizan en la presente invención para mejorar la penetración de péptido, tales disolventes se pueden administrar puros o diluidos con otras soluciones, tales como PBS. Las proporciones de mezclas pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 9:1 (penetrante a diluyente). Preferentemente, el potenciador de penetración no se diluye.

Ultrasonido de baja frecuencia. Mitragotri *et al.*, publicó que incluso las moléculas de proteína grandes, tales como la insulina (peso molecular 6.000), IFN-(peso molecular 17.000), y la eritropoyetina (peso molecular 48.000) podrían ser coaxiales al cruzar el estrato córneo, a aproximadamente 12% de la eficacia, utilizando un ultrasonido de

baja frecuencia (Mitragotri *et al.*, *Science* 269:850-853 (1995)). El ultrasonido trabaja sobre la piel mediante efectos no térmicos, cavitacionales, creando microburbujas que expanden y contraen el estrato córneo, resultando en un incremento transitorio de la permeabilidad. La cavitación ocurre a ondas de sonido de frecuencia mucho menor (es decir, aproximadamente 20 KHz) que la imagen de diagnóstico tradicional (2-12 Mhz); requiriendo ambas aplicaciones una intensidad de aproximadamente 0,2 W/cm².

Electroporación- Vanbever *et al.*, describió que aproximadamente un 10% de la molécula pequeña (peso molecular 267), metoprolol, se podría transportar a través de la piel durante 4 horas después de 5 pulsos individuales de 450 V (Vanbever *et al.*, *Pharm. Res.* 11:1000-1003 (1994)). La electroporación se ha utilizado ampliamente para la permeabilización de las membranas celulares con el objetivo de conseguir que el ADN entre en las células. El transporte transdérmico de péptidos se puede llevar a cabo mediante la exposición localizada de la piel a pulsos de campo eléctrico de elevada intensidad, que puede crear poros acuosos transitorios en las bicapas lipídicas.

Iontoforesis - Bodde *et al.* descubrió que sólo aproximadamente 0,4% por hora de vasopresina (peso molecular 1084) cruzó el estrato córneo (Bodde *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.* 17:943-945 (1990)). La iontoforesis implica la exposición de la piel a corriente de intensidad baja. Las moléculas polares se mueven en respuesta a la corriente. Sin embargo, se cree que el transporte ocurre vía glándulas o folículos pilosos que se proyectan a través de la epidermis abajo hacia la dermis. En consecuencia, el procedimiento no se puede adecuar idealmente para proporcionar el acceso de las células de Langerhans epidérmicas a los péptidos permeadores. Sin embargo, el procedimiento está dentro del alcance de la presente invención.

Administración intraepidérmica - Ciertamente, el estrato córneo se puede penetrar utilizando instrumentos afilados. De este modo, son posibles las inyecciones intraepidérmicas utilizando agujas biseladas y jeringas tradicionales. De forma similar, es posible asimismo la introducción de agentes antigénicos en la epidermis utilizando instrumentos dentados, como los que se utilizan para la administración del ensayo tina. Tales procedimientos físicos invasivos pueden solucionar el problema de la penetración y pueden incluso proporcionar señales migratorias concomitantes a las células de Langerhans. Sin embargo, tales procedimientos pueden frustrar algunas de las ventajas clave de la presente invención, tales como la facilidad de la aplicación tópica sin la necesidad de instrumentos estériles o de personal sanitario altamente preparado. Además, la utilización de procedimientos invasivos se acompaña siempre de un riesgo incrementado de infección.

Inducción de migración celular de Langerhans

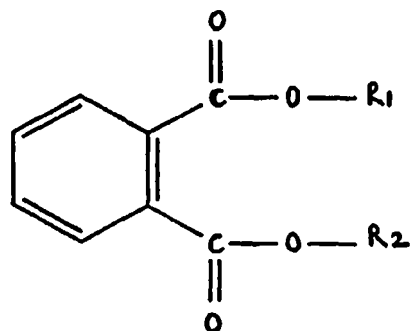
Aunque poner en contacto eficazmente los antígenos con las células de Langerhans en la epidermis es necesario para la práctica del procedimiento de vacunación tópica actual, no es en sí mismo suficiente para inducir la fuerte inmunidad específica de antígeno deseada para un procedimiento de vacunación. De hecho, es la segunda etapa, la inducción de la migración celular de Langerhans, la que continuó poco clara durante mucho tiempo hasta la presente invención. Aunque el fenómeno de la migración celular de Langerhans desde el epitelio a los nodos de linfa se ha conocido muy bien durante muchos años, no se comprenden bien las rutas reguladoras complejas que controlan la migración celular de Langerhans y la diferenciación *in vivo*. Además, existe aparentemente un número de malentendidos comúnmente mantenidos respecto a la migración celular de Langerhans. Por ejemplo, algunos investigadores creen que la migración espontánea y/o continua de las células de Langerhans es suficiente para la inducción de la inmunidad específica de antígeno (ver, por ejemplo, Matsuno *et al.*, *J. Exp. Med.* 183:1865 (1996)). Otros en el campo creen que el hecho que antígenos sensibilizadores por contacto sean capaces de inducir la migración celular de Langerhans por sí mismos, indica que no se necesita un estímulo de inducción separado para ningún antígeno (ver, por ejemplo, Udey. *Clin. Exp. Immunol.* 107:6 (1997)). En consecuencia, los científicos que utilizan FITC en acetona y en ftalato de dibutilo para estudiar la migración celular de Langerhans creen que es el antígeno (FITC) el que induce la migración (ver por ejemplo, Tang *et al.*, *J. Immunol.* 88:284 (1996)). En resumen, el estado de la técnica en este campo en la actualidad, no contempla ni la existencia de inductores exógenos de la migración celular de Langerhans, ni un papel para tales inductores en una inmunidad específica de antígeno intensificada.

En el presente, la investigación en la regulación de la migración celular de Langerhans se enfoca en la producción de citocinas y quimiocinas mediante una variedad de células, lo que parece modular la migración celular de Langerhans y la maduración *in vitro*. Por ejemplo, el factor estimulador de la colonia granulocito-macrófago (GM-CSF) y la interleucina-1 α (IL-1 α) pueden mediar la maduración *in vitro* (Larregina *et al.*, *Immunology* 87:317-325, 1996). El factor α de necrosis de tumor (TNF- α) está implicado en la migración celular de Langerhans (Banchereau y Steinman, *Nature* 392:245 (1998)). Otros factores implicados en el control de diversos aspectos de la maduración y/o la migración celular de Langerhans incluyen MIP-1 α , IL-4, receptores acoplados a la proteína G para el péptido relacionado con el gen de calcitonina, C5a y otras quimiocinas (Banchereau y Steinman, *Nature* 392:245 (1998)). De esta manera, aunque se han identificado muchas señales y rutas de señalización posibles, el esquema regulador sigue poco claro.

Además, las señales y rutas elaboradas descritas anteriormente tienden a enfocar sobre la respuesta "normal" a las brechas traumáticas de la epidermis. Los inductores exógenos de la migración celular de Langerhans no se han considerado antes de este trabajo por el presente inventor. De hecho, los investigadores no habían reconocido ni siquiera que la estimulación de la migración celular de Langerhans era una etapa crítica en la inducción terapéutica de la inmunidad específica de antígeno.

ES 2 283 053 T3

Los compuestos con la capacidad para inducir la migración celular de Langerhans se pueden representar por la fórmula general:



en la que R_1 y R_2 son independientemente, cadenas laterales de alquilo o arilo que contienen de 1 a 16 átomos de carbono. Las mitades arilo son preferentemente mitades fenilo o bencilo sustituidas o no sustituidas. En una forma de realización particularmente preferida, los grupos R_1 y R_2 son mitades alquilo idénticas de 2 a 6 átomos de carbono, tales como ftalato de dibutilo, en los que R_1 y R_2 son $(CH_2)_3-CH_3$.

Los compuestos que son útiles como inductores de la migración celular de Langerhans se pueden seleccionar utilizando los procedimientos FITC estándar descritos para los datos presentados en las figuras 1-3. Se afeitó el abdomen de los ratones C57BL6 y se pintaron con 100 μ l de solución de ensayo, que contenía 5 mg/ml de FITC en una mezcla 50/50 (v/v) de acetona y de inductor de migración (por ejemplo, ftalato de dibutilo). Después de 2 días, se eliminó el nodo de linfa inguinal drenante y se determinó el número total de células dendríticas (tanto FITC+ como FITC-) mediante citometría de flujo e inmunoensayo MHC de clase II.

Los compuestos específicos que comprende la presente invención para la inducción de la migración celular de Langerhans se proporcionan a continuación:

<u>Abreviación</u>	<u>Compuesto</u>
DBP	ftalato de dibutilo
DBT	D-tartrato de dibutilo
DET	N,N-dietiltoluamida
DBF	fumarato de dibutilo
DEHF	fumarato de di(2-etilhexilo)
DIOM	maleato de diisooctilo
DEHM	maleato de di(etilhexilo)
DIOF	fumarato de diisooctilo
BA	ácido benzoico
BC	cloruro de benzalconio
C	alcanfor
BM	maleato de bihenilo
DOP	ftalato de dioctilo
DBM	maleato de dibutilo
DOM	maleato de dioctilo
DBS	succinato de dibutilo
DOS	succinato de dioctilo

ES 2 283 053 T3

	DNP	ftalato de dinonilo
	DINP	ftalato de diisononilo
5	DMP	ftalato de dimetilo
	DEP	ftalato de dietilo
10	DPP	ftalato de dipropilo
	DphP	ftalato de difenilo
	DBBP	ftalato de dibencilbutilo
15	DMEP	ftalato de dietilmetilo

Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 7. Las células MHC de clase II se incrementaron sobre la línea de base para la mayoría de los compuestos ensayados. DNP, C, DBBP, DBT y DINP estuvieron dentro de 1 desviación estándar del control positivo, ftalato de dibutilo (DBP).

Además de los inductores químicos de la migración celular de Langerhans, el presente inventor ha encontrado que el ultrasonido de baja frecuencia muestra asimismo resultados positivos en el procedimiento de selección de la migración de FITC descrito anteriormente. De este modo, en una forma de realización de la presente invención, se puede utilizar el ultrasonido de baja frecuencia tanto como un penetrador y/o como un inductor de la migración celular de Langerhans.

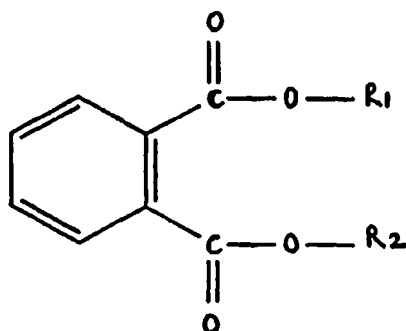
Los péptidos/antígenos utilizados según la presente invención se pueden aplicar por lo general tópicamente a sitios epidérmicos o epitelios en un intervalo de dosis de aproximadamente 1 μ g/ml a aproximadamente 100 mg/ml. Preferentemente, los antígenos de péptido se pueden administrar dentro del intervalo de dosis de 1 mg/ml a 10 mg/ml. La administración tópica a la piel puede incluir de 0,01 a 1 ml de volúmenes de aplicación, preferentemente aproximadamente de 0,05 a 0,5 ml. Por lo general, se puede aplicar un volumen menor cuando se selecciona la ruta de administración vaginal o de otra membrana mucosa. Se pueden seleccionar las rutas de administración a partir de cualquier sitio de membrana mucosa y/o epidérmica incluyendo, la piel, administración intravaginal, rectal, aerosol a las vías respiratorias y pulmones, y posiblemente administración al tracto GI para algunos antígenos. Donde se aplican los inductores químicos de migración celular de Langerhans, el inductor químico se puede aplicar puro o mezclado con un disolvente orgánico, tal como acetona, en un intervalo de proporciones de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 9:1 (inductor a disolvente), preferentemente en el intervalo de proporciones de aproximadamente 3:7 a aproximadamente 7:3 y más preferentemente en una proporción de aproximadamente 1:1.

En algunos casos, puede ser ventajoso, simplemente aumentar la migración celular de Langerhans, sin administrar específicamente ningún antígeno. Por ejemplo, en un individuo que padece cáncer de piel, tal como melanoma o carcinoma celular basal, puede ser útil para intensificar la respuesta inmune contra el tumor administrar un inductor de la migración celular de Langerhans a los sitios de alrededor del tumor, antes de la cirugía. De forma alternativa, la administración tópica puede darse después de la excisión y la posterior quimioterapia y/o radiación.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un kit de partes que contiene:

- un antígeno
- unos medios para intensificar la penetración de dicho antígeno a través de la epidermis o del epitelio de un mamífero, siendo dichos medios un disolvente lipofílico y/o un estímulo físico seleccionado de entre el grupo constituido por un ultrasonido de baja frecuencia y un campo eléctrico;
- un inductor de la migración celular de Langerhans, que comprende un compuesto de la forma de



en el que R_1 y R_2 son independientemente cadenas laterales de alquilo o de arilo que contienen de 1 a 16 átomos de carbono para la preparación de un medicamento para intensificar la respuesta inmune contra dicho antígeno en un mamífero mediante administración tópica.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dichas composiciones se van a administrar a un sitio de membrana epidérmica o mucosa de dicho mamífero.

3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho antígeno es un péptido de aproximadamente 3 a 20 residuos de aminoácidos de longitud.

4. Utilización según la reivindicación 3, en la que dicho péptido es de 8 a 14 residuos de aminoácidos de longitud.

5. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho péptido se va a administrar a una concentración en un intervalo de aproximadamente $1 \mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 100 mg/ml .

6. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho disolvente lipofílico se selecciona de entre el grupo constituido por alquilsulfuros y alquilsulfóxidos simétricos o asimétricos, en la que dicho grupo alquilo contiene de 1 a 16 átomos de carbono.

7. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho disolvente lipofílico es el sulfóxido de dimetilo.

8. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho inductor de la migración celular de Langerhans se selecciona de entre el grupo constituido por ftalato de dibutilo, ftalato de dioctilo, ftalato de dinonilo, ftalato de diisononilo, ftalato de dimetilo, ftalato de dietilo, ftalato de dipropilo, ftalato de difenilo, ftalato de dibencilbutilo y ftalato de dietilmetilo.

9. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho inductor de la migración celular de Langerhans es ultrasonido de baja frecuencia.

10. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho inductor de la migración celular de Langerhans es el ftalato de dibutilo.

11. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho disolvente lipofílico se selecciona de entre el grupo constituido por cetonas de dialquilo simétricas o asimétricas, en el que dicho grupo alquilo contiene de 1 a 16 átomos de carbono.

12. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho disolvente lipofílico es la acetona.

13. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho campo eléctrico se adapta a la electroporación o iontoforesis o combinaciones de las mismas.

ES 2 283 053 T3

14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno procede de una fuente seleccionada de entre el grupo constituido por tumores, virus, bacterias y parásitos.

5 15. Utilización de una cantidad eficaz de un inductor de la migración celular de Langerhans para la preparación de un medicamento para intensificar una respuesta inmune en un mamífero mediante la administración tópica de dicho inductor de la migración celular de Langerhans, seleccionándose dicho inductor de entre el grupo constituido por ftalato de dibutilo, D-tartrato de dibutilo, N,N-dietiltoluamida, fumarato de dibutilo, fumarato de di(2-etilhexilo), maleato de diisooctilo, maleato de dietilhexilo, fumarato de diisooctilo, ácido benzoico, cloruro de benzalconio, maleato de bihenilo, ftalato de dioctilo, maleato de dibutilo, maleato de dioctilo, succinato de dibutilo, succinato de dioctilo, 10 ftalato de dinonilo, ftalato de diisononilo, ftalato de dimetilo, ftalato de dietilo, ftalato de dipropilo, ftalato de difenilo, ftalato de dibencilbutilo, ftalato de dietilmetilo y alcanfor.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

INDUCTORES TÓPICOS DE LA MIGRACIÓN CELULAR DE LANGERHANS

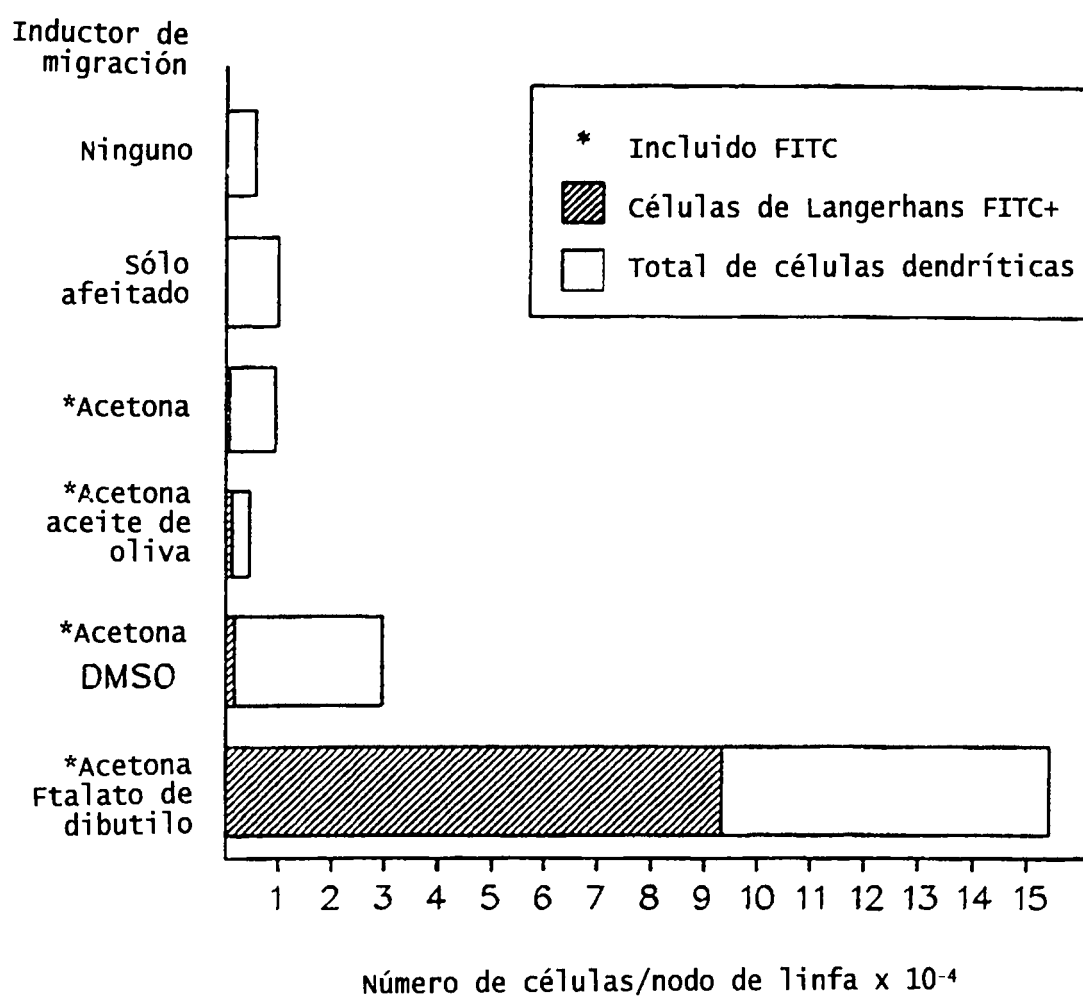


FIG. 1

CÉLULAS DENDRÍTICAS EN UN NODO DE LINF A DESPUÉS DE PINTAR LA PIEL

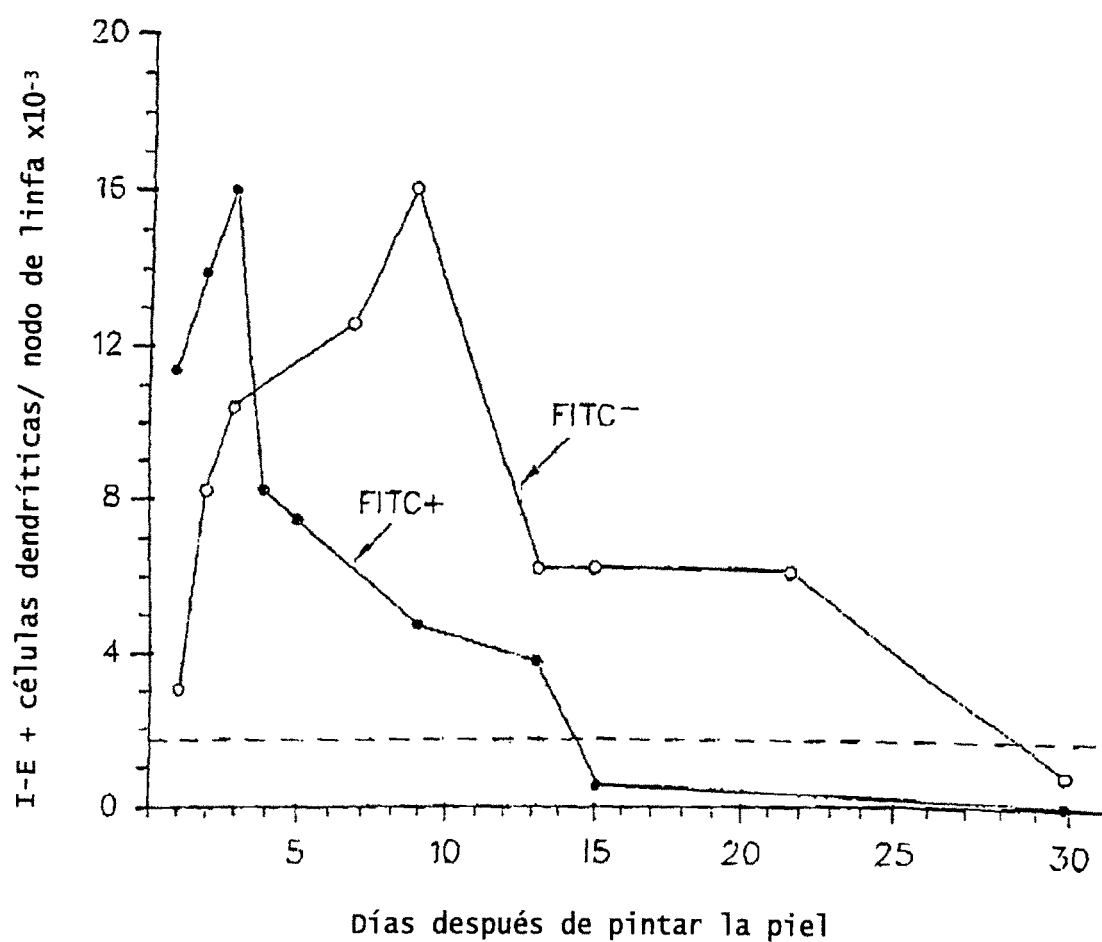


FIG. 2

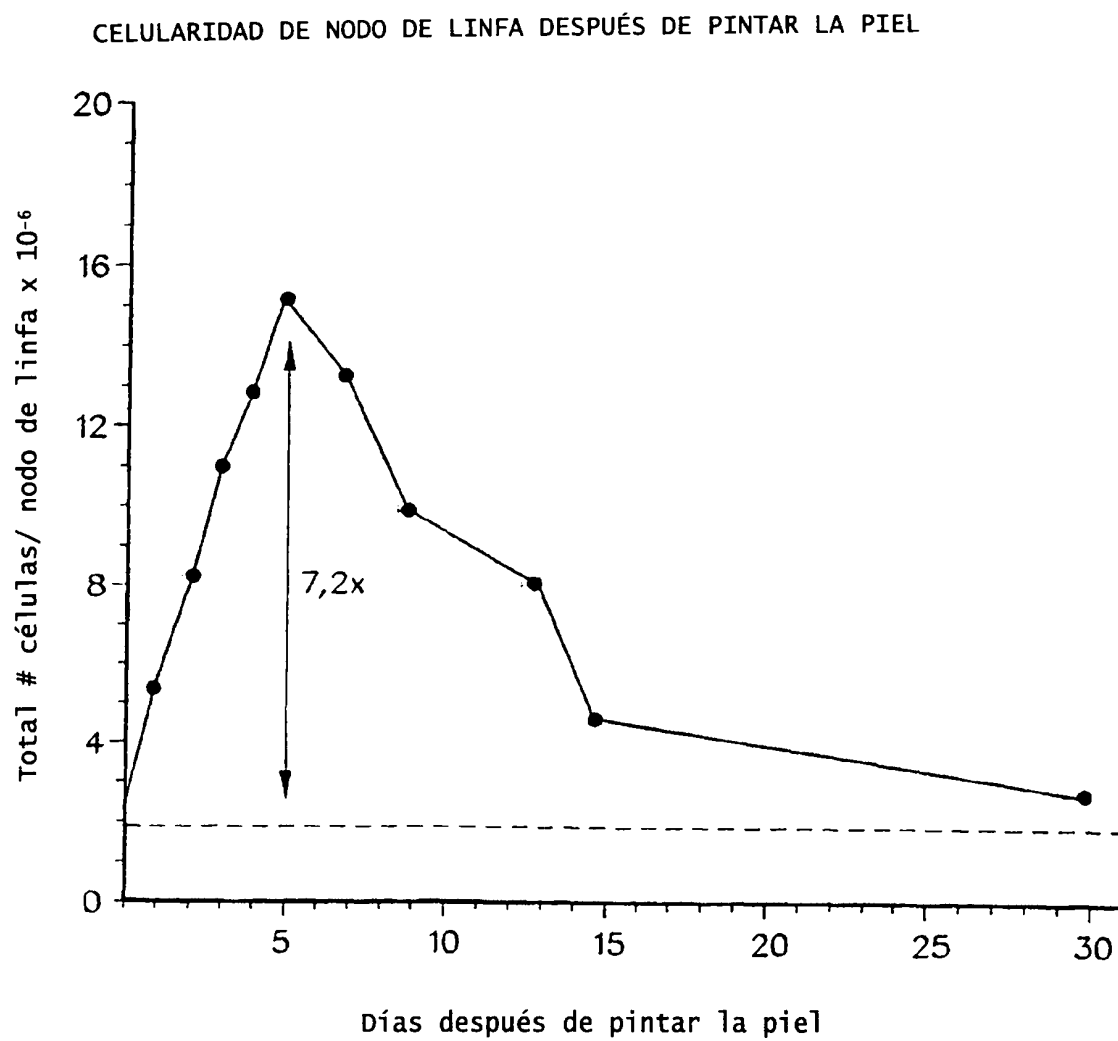


FIG. 3

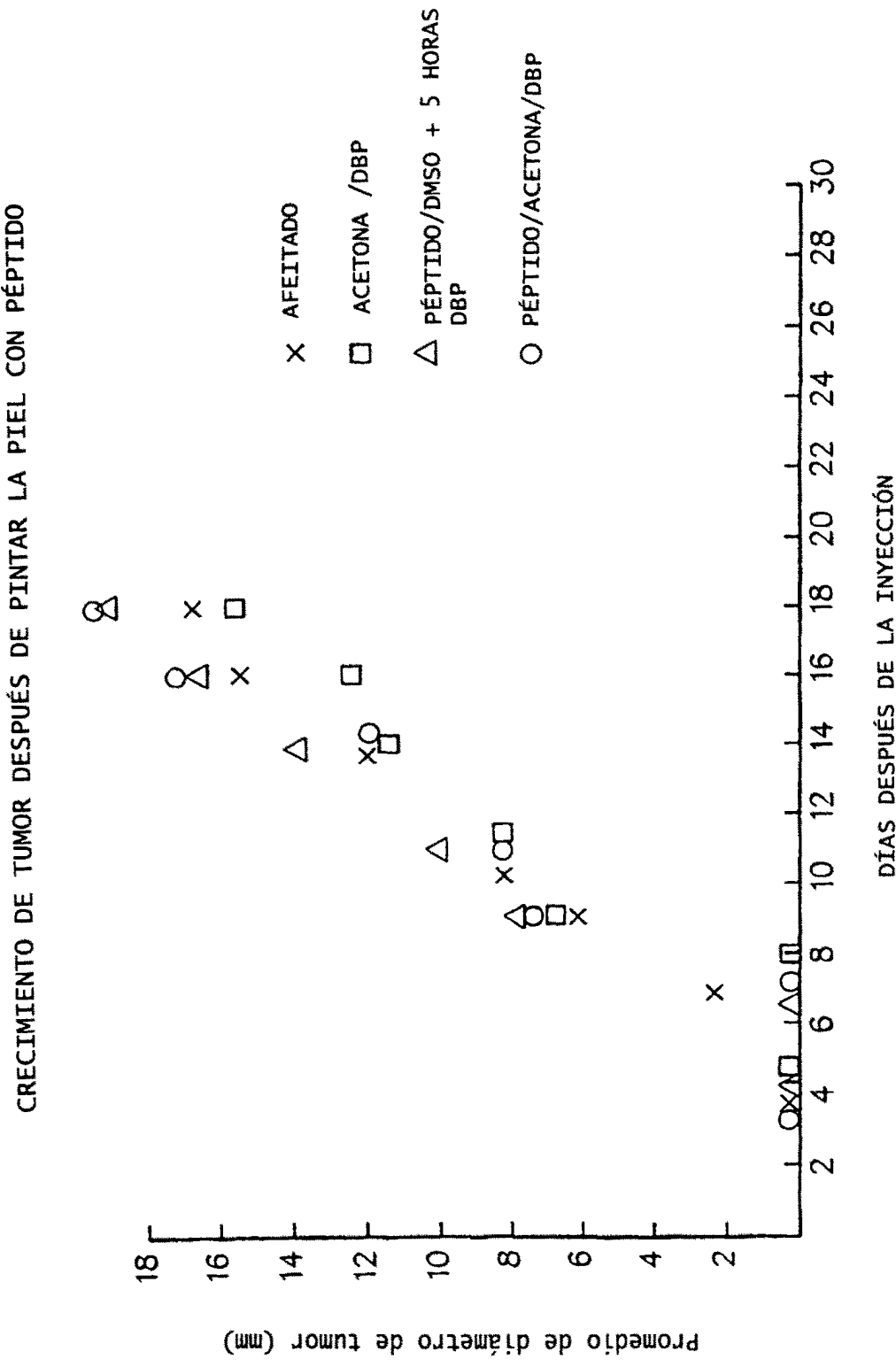
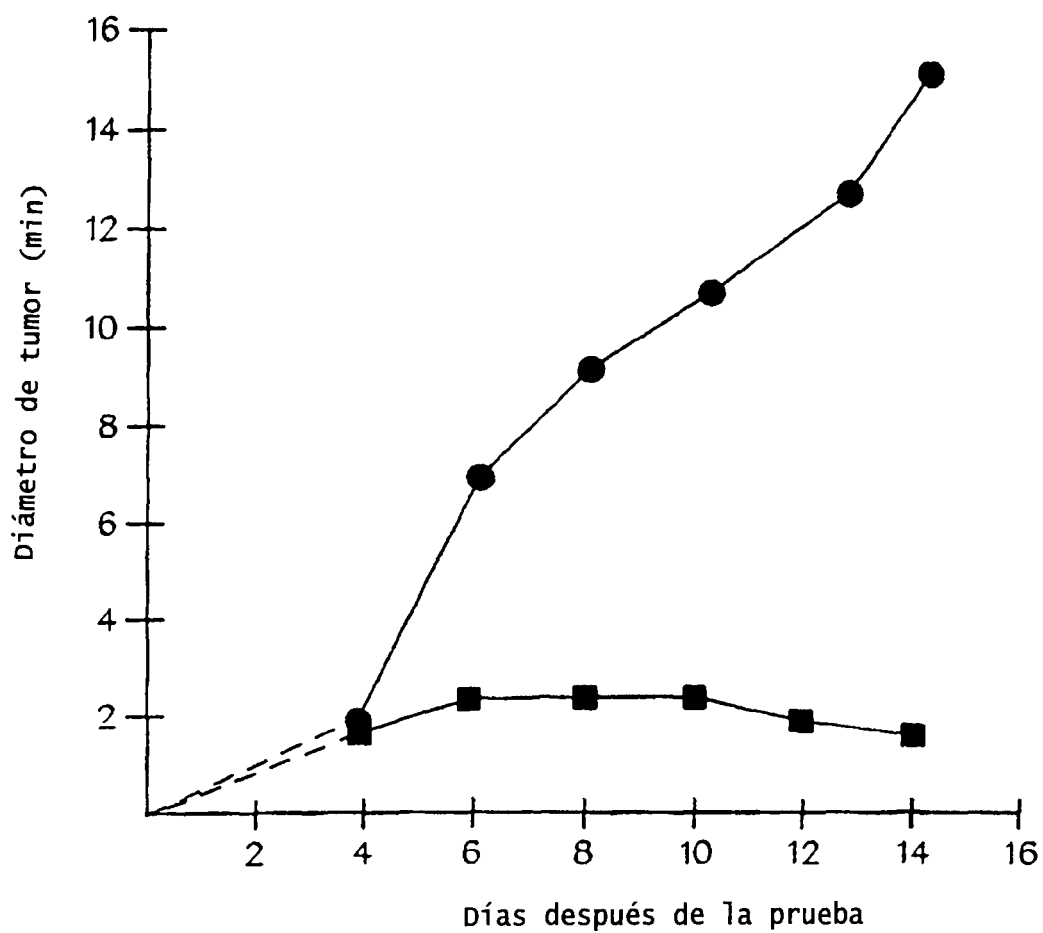


FIG. 4

Aplicación tópica intravaginal de péptido y ftalato de dibutilo
que induce la inmunidad protectora de tumor



Tratamiento

240 μ g de péptido en 10 μ l
10 μ l de DBP/acetona 1 hora después

- EL4
- EG7-OVA
- Espesor de piel normal

FIG. 5

Inmunidad específica de tumor inducida por la aplicación cutánea
de péptido OVA en DMSO seguida de DBP

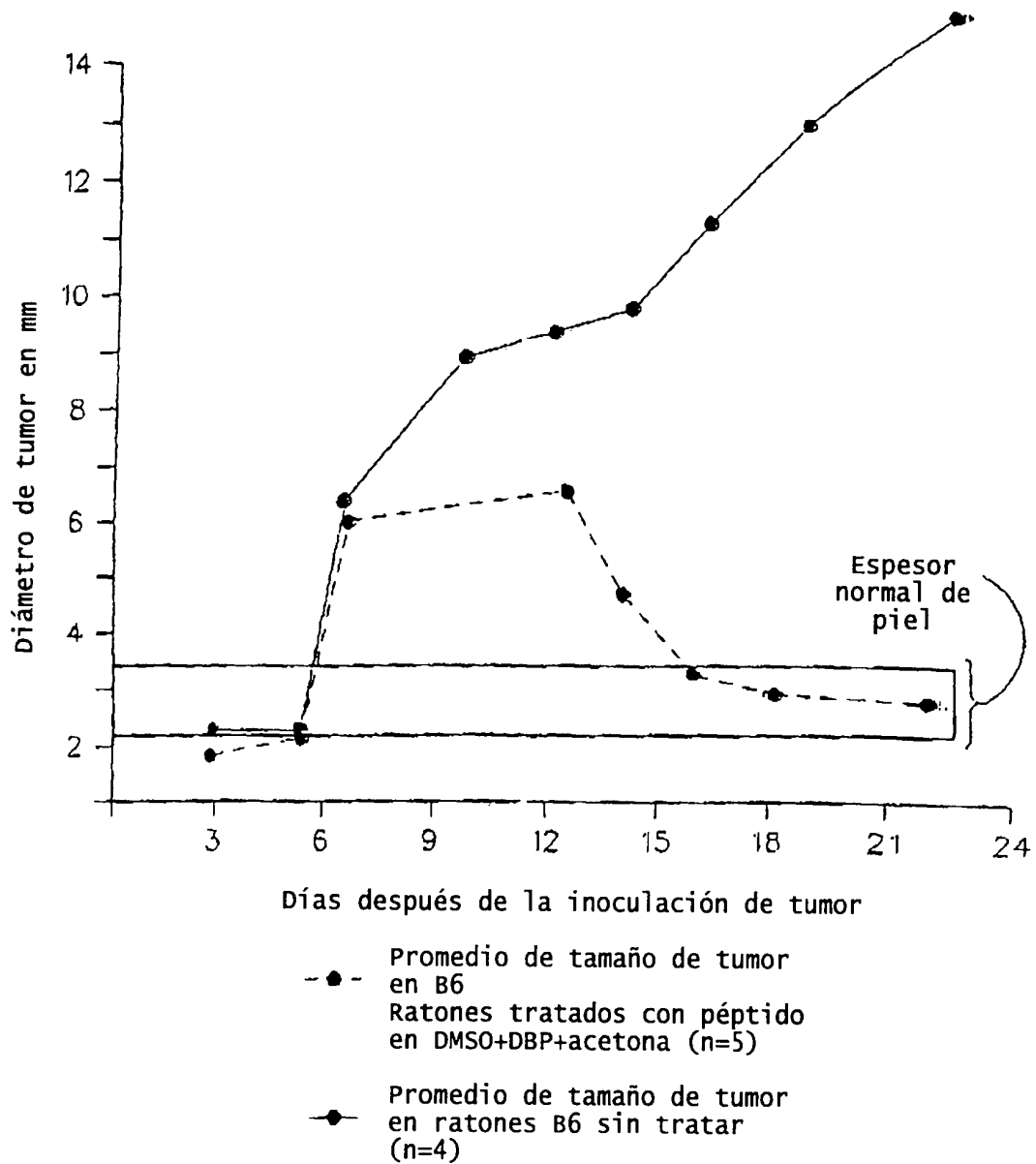


FIG. 6

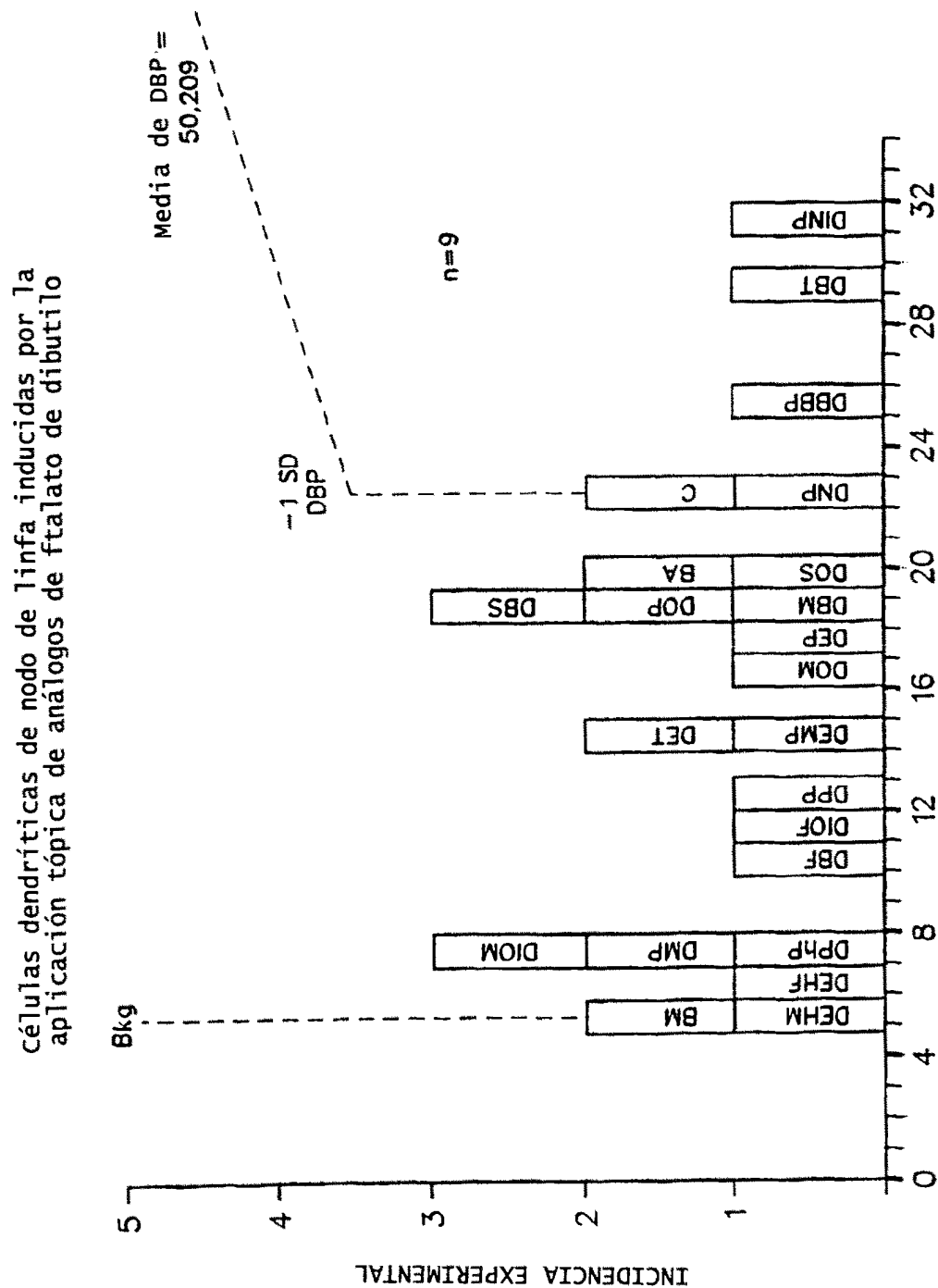


FIG. 7 Número de células de clase III $\times 10^3$ / nodo de linfa en el día 2

ES 2 283 053 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LIDAK PHARMACEUTICALS

5 <120> INMUNOESTIMULACIÓN TÓPICA PARA INDUCIR LA MIGRACIÓN CELULAR DE LANGERHANS
<130> P.KNOB.104/EP(WO)
<140> 98918392.6
<147> 1998-04-20

10 <160> 1
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1

15 <211> 8
<212> PRT
<213> Ovoalbúmina de pollo

20 <400> 1
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

25

30

35

40

45

50

55

60

65