

19 Aprile

Immunizzazione cutanea

*C'è una crepa in ogni cosa
ed è da lì che entra la luce.*

Leonard Cohen

Applicazione topica sulla pelle

L'uso della pelle per la somministrazione di vaccini ha una storia che è iniziata in India 10000 anni fa quando si praticava una proto-immunizzazione grattando le croste dai vaiolosi che venivano applicate su quella di individui sani, procedure che nel corso dei secoli si sarebbero perfezionate con l'utilizzo dell'ago biforcuto.

Sebbene la pelle abbia avuto un ruolo storico nell'immunizzazione, l'uso dell'applicazione topica del vaccino come modalità generale di immunizzazione ha ricevuto attenzione solo di recente. La semplice applicazione topica di un vaccino in genere non produce una risposta immunitaria adeguata, sebbene in letteratura si possano riscontrare sporadiche segnalazioni.

La somministrazione topica di vaccini nella pelle è limitata dalla bassa permeabilità dello strato corneo, lo strato esterno della pelle, che ha uno spessore di 15-20 µm ed è costituito da cheratinociti cornificati incorporati in una *matrice ricca di lipidi*. I lipidi dello strato corneo sono organizzati in una struttura a doppio strato ordinata e, di conseguenza, formano una *ulteriore barriera elettrostatica*

Aumentare la permeabilità dello strato corneo senza irritare i cheratinociti sottostanti è stata una sfida considerevole nel campo di una somministrazione vaccinale. Diverse metodologie innovative sono attualmente in fase di sviluppo per facilitare il rilascio di antigeni nella pelle. Questi includono l'uso di adiuvanti applicati localmente, vettori colloidali capaci di incapsulare i vaccini e integrare metodi fisici per aumentare la permeabilità della pelle ai vaccini

COADIUVANTI TOPICI.

1-Tossina colerica (TC)

L'applicazione topica di adiuvanti come la tossina colerica (TC) insieme al vaccino sulla pelle genera una forte risposta immunitaria sistemica e mucosa. Questo è il più studiato di tutti i metodi di immunizzazione topica. L'applicazione topica della TC fornisce il segnale di attivazione richiesto affinché le cellule del sistema difensivo cutaneo possano attivare la risposta immunitaria. Non è chiaro come la TC, una proteina relativamente grande (86 kDa), possa diffondere attraverso lo strato corneo, ma una possibilità è la permeabilizzazione indotta dall'idratazione dello strato corneo. In studi recenti, tuttavia, la rottura dello strato corneo mediante carta smeriglio (che è una carta abrasiva) è stata utilizzata prima dell'applicazione del vaccino e / o dell'adiuvante per ottenere risposte immunitarie (Frech 2005)

L'efficacia dell'immunizzazione cutanea mediata da adiuvante è stata dimostrata negli animali e studi clinici hanno anche confermato la generazione di una forte risposta IgG e IgA in volontari dopo l'applicazione topica di un fattore di colonizzazione da *Escherichia coli* enterotossigeno insieme ad adiuvanti

Precedenti studi clinici condotti utilizzando *E. coli* l'enterotossina termolabile (LT) come adiuvante ha mostrato che sono stati generati anticorpi della mucosa e questi studi hanno confermato il ruolo delle cellule di Langerhans nell'immunizzazione mediante applicazione di vaccini topici,

come dimostrato dalla forte presenza di queste cellule nella pelle 24-48 ore immunizzazione (Bouwstra, J.2001)

2-Veicoli colloidali

L'incapsulamento dei vaccini in trasportatori colloidali facilita la generazione di una risposta immunitaria dopo l'applicazione topica. Pochi studi hanno riportato l'uso di trasportatori colloidali per la somministrazione topica di vaccini, tutti negli animali.

L'applicazione topica di TT incapsulato in vescicole lipidiche, dopo l'immunizzazione di richiamo, ha suscitato una risposta immunitaria specifica (IgG) paragonabile a quella prodotta dalle iniezioni intramuscolari di TT 65 adsorbito dall'allume. Un altro sistema basato sui lipidi è stato utilizzato per somministrare vaccini a DNA agli animali (Baca-Estrada, ME 2000)

L'applicazione topica di questo vaccino DNA-lipidico ha prodotto sia risposte anticorpali che risposte cellulari. Sistemi di MICROEMULSIONE di etanolo in e nanoparticelle cationiche rivestite con vaccini a DNA sono state utilizzate anche per l'immunizzazione topica del DNA degli animali (Cui Z 2001)

I precisi meccanismi attraverso i quali i vettori colloidali penetrano nello strato corneo rimangono un argomento di ricerca. Resta anche da vedere se i risultati ottenuti dagli studi sugli animali possano essere tradotti sull'uomo.

3-Iniezioni a getto di liquido

L'iniezione a getto è il metodo più antico di immunizzazione senza ago, il suo impiego può essere fatta risalire alla fine del 1800, quando nella letteratura medica fu riportata una tecnica nota come "aquapuncture" (Weniger, BG 2005)

Questo dispositivo è stato utilizzato per erogare getti d'acqua e altri liquidi per applicazioni diverse dall'immunizzazione: ad esempio, per il trattamento della nevralgia incontrollata. Tuttavia, è stato all'inizio degli anni '50 quando le iniezioni di jet hanno preso il loro posto come metodo senza ago per somministrare farmaci e vaccini identificando nella pelle un tessuto sottolineando come la vaccinazione cutanea (Babiuk 2000)

Un iniettore a getto di liquido utilizza l'energia cinetica di un getto di vaccino ad alta velocità (in genere più di 100 m al secondo) con un diametro che va da 76 µm a 360 µm, che è inferiore al diametro esterno di un ago ipodermico standard (810 µm per un ago 21G). I getti di liquido penetrano nella pelle e rilasciano il vaccino a li vello intradermico nella pelle nel tessuto sottocutaneo permeando il muscolo .

L'epidermide contiene nei suoi strati le cellule di Langerhans che formano una rete che assorbe l'antigene consente loro di assorbire l'antigene in modo efficiente e quindi di svolgere la sorveglianza immunitaria e di costituire una linea di difesa immunitaria dopo che la barriera fisica viene violata.

Le cellule di Langerhans iniziano risposte immunitarie specifiche elaborando e presentando frammenti di antigene alle cellule T ingenui nei linfonodi Le cellule epidermiche di Langerhans svolgono un ruolo centrale nella risposta immunitaria mostrando recettori multipli sulla superficie cellulare e secernendo una varietà di citochine importanti nella patogenesi della dermatite da contatto, dermatite atopica, istiocitosi X, infezione da HIV-1, e rigetto dell'innesto cutaneo (HogaN ad 1995)

Ciò promuove la generazione di risposte immunitarie umorali sia sistemiche (IgG e IgM) che mucose (IgA) (Gockel, CM, Glenn, GM 2000) Puntare il vaccino sulla pelle ne favorisce il contatto con le cellule di Langerhans e riduce la dose di vaccino richiesta un fattore che diventerebbe cruciale in un momento di carenza di vaccini, come nella attuale pandemia. I vaccini somministrati da iniettori a getto di liquido tipicamente si diffondono in un volume di tessuto maggiore dopo l'iniezione rispetto ai vaccini somministrati con aghi (Baxter, J.2004) il che potrebbe consentire loro di stabilire un contatto migliore o più rapido con le cellule che presentano l'antigene prima che vengano degradati.

4- Il sistema (MUNJI)

Le iniezioni a getto di liquido sono state rese popolari per la prima volta dagli iniettori a getto multiuso (MUNJI), che consentono l'iniezione di diverse dosi utilizzando lo stesso ugello e serbatoio di vaccino a una velocità fino a 1.000 immunizzazioni all'ora. I MUNJI sono stati utilizzati con successo per immunizzare gli esseri umani con vaccini vivi contro il morbillo e il vaiolo, nonché vaccini non viventi contro il colera, l'epatite B, l'influenza e la poliomielite

Gli iniettori a getto di liquido offrono diversi vantaggi oltre a evitare l'uso di oggetti taglienti. Hanno una lunga storia di utilizzo e funzionano con le formulazioni di vaccini esistenti che sono state sviluppate per la somministrazione basata su aghi. In un esempio, hanno portato a tassi di conversione più elevati, ma le ragioni di ciò non sono chiare (Williams, J. 2000)

Allo stesso tempo, gli iniettori a getto di liquido hanno diversi limiti. In alcuni studi, erano associati a livelli di dolore più elevati rispetto alle iniezioni con ago, specialmente quando si utilizzavano dispositivi MUNJI più vecchi. Gli iniettori a getto di liquido sono stati anche associati a reazioni nel sito più frequenti rispetto agli aghi, come dolore, arrossamento e gonfiore del sito di iniezione

Forse il principale problema di sicurezza associato ai MUNJI è l'aumento del rischio di contaminazione da soggetto a soggetto. Negli anni '80, la diffusione dell'HBV tra i soggetti era collegata alle iniezioni a getto di liquido [28](#).

Spruzzi di piccole quantità di sangue o liquido interstiziale sull'ugello del MUNJI sono stati accusati di questa diffusione dell'HBV. Studi sistematici hanno dimostrato che i MUNJI possono trasmettere notevoli volumi di sangue (più di 10 pl) da un soggetto all'altro quando i MUNJI vengono utilizzati su più soggetti. Si presume che questo volume di sangue sia sufficiente per trasmettere l'infezione da HBV

L'OMS e il CDC raccomandano che i MUNJI siano utilizzati per l'immunizzazione di massa solo quando i guadagni derivanti dall'immunizzazione rapida superano i rischi di malattie trasmesse per via ematica: ad esempio, durante le pandemie influenzali o gli attacchi di bioterrorismo. Per ridurre al minimo il rischio di contaminazione, sono stati sviluppati dispositivi di protezione monouso per coprire la superficie dell'iniettore e gli studi effettuati con questi dispositivi non hanno mostrato alcun rischio di contaminazione

Sono stati sviluppati anche iniettori a getto a cartuccia usa e getta (DCJI, che sono iniettori non usa e getta a cui sono collegati ugelli usa e getta per ogni utilizzo) per alleviare le preoccupazioni sulla contaminazione. Sono inoltre in fase di sviluppo dispositivi monouso preriempiti monouso per alleviare queste preoccupazioni sulla contaminazione, e questi dispositivi presentano una nuova direzione negli iniettori a getto di liquido

Oltre ai vaccini convenzionali, alcuni DCJI sono stati utilizzati efficacemente anche per eseguire la vaccinazione a DNA contro la febbre dengue e l'influenza negli animali

Numerosi iniettori a getto di liquido sono già sul mercato e vengono utilizzati per vari vaccini, compresi quelli contro l'influenza e l'epatite B. Gli iniettori a getto di liquido più nuovi e più convenienti vengono continuamente sviluppati, principalmente da piccole aziende. Sebbene nell'ultimo decennio siano stati compiuti progressi tecnologici sostanziali, la scienza fondamentale che sta alla base delle iniezioni a getto di liquido non è ben compresa. Solo recentemente sono stati riportati in letteratura studi su vari aspetti fondamentali delle iniezioni a getto di liquido, come la dinamica del fluido a getto, la meccanica della penetrazione del getto e la dinamica della dispersione del getto. Si spera che questa comprensione, insieme ai progressi tecnologici, porterà a dispositivi migliori e più economici.

METODI BALISTICI

I metodi basati su bombardamento di particelle della pelle (noti anche come metodi balistici) accelerano i vaccini in polvere in modo che penetrino nello strato esterno della pelle (cioè lo strato corneo) e si depositino nell'epidermide o negli strati superficiali del derma, un metodo noto come immunizzazione epidermica con polvere (EPI) (Kendal M 2004)

La tecnica balistica è stata sviluppata per la prima volta nel 1986, per il trasporto di particelle metalliche rivestite di DNA di 1 µm di diametro nelle piante per modificarle geneticamente, ed era nota come pistola genetica. All'inizio degli anni '90, il metodo balistico è stato sviluppato in dispositivi per la somministrazione di vaccini sia convenzionali che a DNA per gli esseri umani .

A differenza degli iniettori a getto di liquido, che erogano abitualmente il vaccino nello spazio sottocutaneo o intramuscolare, i metodi balistici erogano il vaccino principalmente agli strati superficiali della pelle e quindi prendono di mira naturalmente le cellule di Langerhans.

1. Immunizzazione epidermica con polvere (EPI)

Diversi vaccini sono stati somministrati ad animali che utilizzano EPI. Il vaccino antinfluenzale, quando somministrato insieme ad adiuvanti come la tossina del colera (CT) da EPI, ha suscitato risposte anticorpali sieriche e mucose aumentate nei topi rispetto a quelle negli animali non immunizzati

Risultati simili sono stati riportati per il tossoide difterico (DT). La co-somministrazione di adiuvanti ha aumentato i titoli di IgG dopo l'immunizzazione basata su EPI contro la difterite e l'influenza . L'EPI è stato utilizzato anche per fornire vaccini a DNA agli animali.

Piccole (1-3 µm) particelle di oro o tungsteno rivestite di DNA rilasciate dall'EPI penetrano direttamente nei cheratinociti epidermici o nelle cellule di Langerhans e inducono l'espressione degli antigeni codificati

Sono stati anche adottati ulteriori mezzi per capitalizzare le proprietà immunostimolatorie delle cellule di Langerhans, ad esempio la co-somministrazione di DNA che codifica le citochine (come l'interleuchina-6) o gli inibitori dell'apoptosi

Gli inibitori dell'apoptosi aumentano la sopravvivenza delle cellule di Langerhans dopo un trauma meccanico indotto da particelle e l'espressione delle citochine facilita la migrazione delle cellule di Langerhans, che è tipicamente promossa da mediatori pro-infiammatori.

Ci sono meno segnalazioni di EPI degli esseri umani. In uno studio, l'EPI ha somministrato efficacemente il vaccino antinfluenzale all'uomo. Per tutti i ceppi di virus influenzali, i titoli di IgG erano equivalenti nei gruppi in cui è stato utilizzato l'EPI e negli individui immunizzati con ago.

Anche gli studi clinici di immunizzazione con DNA utilizzando metodi balistici hanno prodotto risultati incoraggianti. L'immunizzazione del DNA basata su EPI contro l'infezione da HBV ha indotto alti titoli di anticorpi protettivi, nonché risposte immunitarie cellulo-mediate, negli esseri umani. Nonostante i risultati promettenti negli studi clinici, tuttavia, lo sviluppo commerciale dell'EPI per i vaccini convenzionali sembra essere stagnante. Invece, gli attuali sforzi di sviluppo nell'industria sono concentrati interamente sui vaccini a DNA.

L'EPI offre diversi vantaggi come modalità di immunizzazione. L'uso di polveri semplifica la manipolazione e lo stoccaggio rispetto alle formulazioni liquide. L'EPI prende naturalmente di mira anche le cellule di Langerhans e consente la loro trasfezione diretta.

METODI FISICI

Sono state utilizzate anche tecniche fisiche che utilizzano microneedles, stripping del nastro, ultrasuoni, microporazione o elettroporazione per somministrare vaccini attraverso la pelle. La maggior parte di queste tecniche, sebbene ben studiate per applicazioni generali di somministrazione di farmaci, sono emerse solo di recente come potenziali tecniche di immunizzazione.

1.Microporazione

Nella tecnica di microporazione, un processo di vaporizzazione (che comporta la deposizione mirata di energia termica nella pelle attraverso un elemento riscaldato elettricamente) viene utilizzato per rimuovere piccole aree dello strato corneo, esponendo così l'epidermide immunocompetente. In uno studio, in topi glabri, l'applicazione di un vettore adenovirale alla pelle microporata ha prodotto risposte immunitarie cellulari e umorali 10-100 volte maggiori rispetto all'applicazione sulla pelle intatta

2.Microneedles

I microneedles (che sono array solidi e cavi di proiezioni di silicio su scala micrometrica) sono stati utilizzati in diverse occasioni per effettuare immunizzazioni topiche con vari vaccini

3.Array di microproiezione

Gli array di microproiezione sono stati utilizzati per fornire DNA plasmidico nudo, inducendo risposte immunitarie più forti e meno variabili (come giudicato dai titoli di IgG sieriche) rispetto a quelle indotte dalle iniezioni con ago. Hanno anche ridotto il numero di immunizzazioni richieste per la sierconversione completa

In un altro studio, sono stati utilizzati cerotti per microproiezione per fornire un antigene modello, l'ovoalbumina, per generare una forte risposta immunitaria ⁷¹. L'ovoalbumina somministrata mediante microproiezione ha generato una risposta immunitaria fino a 50 volte maggiore di quella osservata dopo la stessa dose somministrata per via sottocutanea o intramuscolare utilizzando un ago.

4.Nastro adesivo

Una manciata di studi ha riportato l'uso del nastro adesivo per facilitare l'assorbimento transdermico del vaccino negli animali ⁷⁴, ⁷⁵. Il peeling ripetuto con nastro adesivo (ad esempio, scotch) rimuove efficacemente lo strato corneo. L'applicazione di peptidi che rappresentano epitopi derivati dal tumore a cellule T citotossiche specifiche per tumore innescate dalla pelle di

topo con nastro adesivo nei linfonodi e nella milza, ha protetto i topi da una successiva sfida con le corrispondenti cellule tumorali e ha soppresso la crescita di tumori consolidati

5.Abrasione Cutanea

L'abrasione cutanea con un rasoio e uno spazzolino da denti seguita dall'applicazione di vettori adenovirali **ha prodotto risultati promettenti negli esseri umani**

8.Ecografia a bassa frequenza

È stato anche dimostrato che l'ecografia, a bassa frequenza (20 kHz), fornisce un vaccino (costituito da TT) ai topi in uno studio [78](#). La risposta immunitaria generata dal vaccino somministrato mediante ultrasuoni era circa dieci volte maggiore per dose unitaria di vaccino entrato nella pelle rispetto a quella che si verificava dopo l'iniezione sottocutanea. (Circa l'1% della dose applicata per via topica è entrato nella pelle)

9.Ultrasuoni

Rispetto alla semplice somministrazione topica, è stato dimostrato che il pretrattamento con ultrasuoni aumenta la somministrazione del vaccino, consentendo così a una quantità sufficiente di vaccino di entrare nella pelle per attivare la risposta immunitaria. È stato dimostrato che gli ultrasuoni aumentano la permeabilità della pelle attraverso la rottura dello strato corneo per cavitazione acustica (che comporta la formazione e il collasso di cavità gassose) Inoltre, l'applicazione degli ultrasuoni ha portato all'attivazione delle cellule di Langerhans, le cui ragioni non sono chiare.

10.Elettroporazione a tensione variabile

l'elettroporazione (che comporta l'applicazione di impulsi elettrici ad alta tensione e di breve durata) è stata utilizzata per aumentare la somministrazione di vaccini a DNA attraverso la pelle dei topi . **È stato anche dimostrato che l'elettroporazione induce una risposta immunitaria efficace dopo la somministrazione transdermica di vaccini peptidici .**

11.Pemeabilizzazione laser

Ulteriori approcci, compreso l'uso della permeabilizzazione laser assistita dello strato corneo e vari modelli di microaghi (diversi da quelli pubblicati nella letteratura peer-reviewed), sono anche perseguiti dall'industria.

La maggior parte dei metodi fisici per l'immunizzazione topica sono stati testati solo su animali, in particolare su topi o ratti. Resta da vedere quanti di questi metodi possono essere applicati alla pelle umana, che differisce sostanzialmente nelle proprietà barriera dalla pelle dei roditori. Si presume che alcuni dei metodi discussi in questa sezione siano stati testati sugli esseri umani per scopi di immunizzazione; tuttavia, questi studi non sono ancora apparsi nella letteratura sottoposta a revisione paritaria.

Conclusioni

L'applicazione topica del vaccino (compreso l'uso di adiuvanti topici, trasportatori colloidali e disturbi fisici) offre diversi vantaggi. La somministrazione sulla pelle è generalmente facile da eseguire e porta a un'elevata compliance dei pazienti . Anche l'applicazione topica del vaccino prende di mira naturalmente le cellule di Langerhans. **Tuttavia, le questioni relative ai costi devono essere studiate in profondità prima che queste tecniche possano essere adottate per applicazioni su larga scala negli esseri umani.** I metodi basati su tecniche fisiche come ultrasuoni, elettroporazione e microporazione utilizzano dispositivi costosi, che potrebbero porre dei limiti alla loro adozione da parte dei paesi in via di sviluppo. L'uso di energia elettrica potrebbe limitare

l'uso diffuso di alcuni di questi metodi, soprattutto per le applicazioni sul campo. Diverse aziende, per lo più piccole imprese, stanno lavorando per affrontare queste sfide.

Riferimenti:

- Kendall, M et al. Consegna balistica intradermica di microparticelle nella pelle umana asportata per applicazioni farmaceutiche. *J. Biomech.* 37 , 1733–1741 (2004).
- Frech, SA et al. Risposte immunitarie migliorate alla vaccinazione antinfluenzale negli anziani utilizzando un cerotto immunostimolante. *Vaccine* 23 , 946–950 (2005).
- Weniger, BG Tecnologia di iniezione a getto senza ago: riferimenti bibliografici, elenco di dispositivi e produttori, elenco di brevetti e risorse generali / varie. *Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie* [in linea], & lt; <http://www.cdc.gov/nip/dev/jetinject.htm#bibliography> & gt; (2005).
- Baxter, J. in *Meccanismi fondamentali di somministrazione di farmaci mediante iniezione a getto: base per lo sviluppo di un iniettore microjet indolore* . 161 Tesi, Univ. California, Santa Barbara (2004).
- Babiuk, S. et al. Vaccinazione cutanea: la pelle come tessuto immunologicamente attivo e la sfida del rilascio dell'antigene. *J. Control. Versione* 66 , 199–214 (2000).
- Scharton-Kersten, T. et al. Immunizzazione transcutanea con esotossine batteriche ribosilanti ADP, subunità e adiuvanti non correlati. *Infettare. Immun.* 68 , 5306–5313 (2000).
- Bouwstra, J. et al. Nuovi aspetti dell'organizzazione della barriera cutanea. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14 (Suppl. 1), 52–62 (2001).
- Baca-Estrada, ME, Foldvari, M., Babiuk, SL & Babiuk, LA Consegna del vaccino: sistemi di somministrazione basati sui lipidi. *J. Biotechnol.* 83 , 91–104 (2000).
- Cui, Z. & Mumper, RJ nanoparticelle a base di chitosano per l'immunizzazione genetica topica. *J. Control. Versione* 75 , 409–419 (2001).
- Hogan AD, Burks AW. Epidermal Langerhans' cells and their function in the skin immune system. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1995 Jul;75(1):5-10; quiz 10-2. PMID: 7621061.
- Williams, J. et al. Somministrazione del vaccino contro l'epatite A: confronto tra iniettore a getto e iniezione con ago. *Vaccine* 18 , 1939-1943 (2000).

