



DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
FARMACÉUTICA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

## **VACUNAS BUCALES Y SUBLINGUALES: UNA REVISIÓN DE LA INMUNIZACIÓN A TRAVÉS DE LA MUCOSA ORAL Y SISTEMAS DE ENTREGA DE VACUNAS.**

### **PATROCINANTE**

Dr. Javier O. Morales M.  
Laboratorio de *Drug Delivery*  
Universidad de Chile

### **DIRECTOR DE MEMORIA**

Dr. Javier O. Morales M.  
Laboratorio de *Drug Delivery*  
Universidad de Chile

Dr. Rikhav P. Gala  
Desarrollo de formulación de vacunas  
Fraunhofer USA Center for Molecular  
Biotechnology

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico  
Valeria Trincado Flores

## Índice de contenidos

Resumen.....	5
Summary.....	6
Introducción .....	7
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
Metodología.....	9
1. Rutas de inmunización mucosal.....	10
2. Sistema inmune mucosal .....	12
2.1 Clasificación de tejidos linfoides asociados a mucosas .....	13
2.2 Comparación entre la vía parenteral; Inmunidad local versus sistémica.....	14
2.3 Inducción de respuestas inmunes efectivas en sitios distantes del sitio de administración.....	17
2.4 Administración sublingual de antígenos como alternativa para el tratamiento de alergias .....	17
3. Sistemas de entrega de antígenos y adyuvantes mucosales de uso común .....	19
3.1 Películas .....	20
3.2 Matriz de microagujas .....	24
3.3 Adyuvantes mucosales .....	28
3.3.1 Enterotoxinas bacterianas.....	29
3.3.2 Agonista del receptor tipo Toll.....	30
3.3.3 Polímeros.....	31
Conclusiones .....	33
Referencias.....	35

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Captación y presentación de antígenos por las células dendríticas a través de la vía de la mucosa oral para la inmunización.....	12
<b>Figura 2.</b> Diferentes tipos de sistemas de película de liberación de mucosa oral y cada una de sus capas. ....	20
<b>Figura 3.</b> Representación de una variedad de microagujas..	24

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Comparación entre rutas de administración. ....	11
<b>Tabla 2.</b> Características de los sistemas de entrega de antígenos. ....	19
<b>Tabla 3.</b> Una recopilación de moléculas informadas utilizadas como adyuvantes de la mucosa. ....	28

## Resumen

Actualmente, la mayoría de las vacunas disponibles en el mercado son de uso parenteral; intramuscular y subcutáneo principalmente. Sin embargo, esto puede no ser la mejor opción en varias ocasiones. Las rutas de administración mucosal como la intranasal, sublingual y bucal, generan gran interés debido a los beneficios que ofrecen. Estos van desde aumentar el cumplimiento del paciente hasta inducir una respuesta inmune más efectiva que la inducida a través de las rutas convencionales. Gracias a la activación del sistema inmune mucosal común, es posible generar una respuesta inmune efectiva tanto sistémica como local, lo cual no es posible lograr a través de la vía parenteral. La protección contra patógenos que utilizan rutas de entrada a las mucosas se proporciona mediante una inducción eficaz de la inmunidad de las mucosas. Se están desarrollando sistemas de liberación por vía mucosal, como películas y microagujas, que han demostrado ser eficaces, seguros y fáciles de administrar. Estos sistemas tienen múltiples ventajas sobre las inyecciones; son sencillas de fabricar, estables a temperatura ambiente e indoloras para el paciente ya que no requieren punción. Por lo tanto, estos sistemas de entrega no necesitan ser administrados por personal médico de hecho, podrían ser autoadministrados. Esta memoria bibliográfica presenta una recopilación de investigaciones en las cuales se desarrollan sistemas de entrega de biológicos. Entre los más relevantes se encuentran las películas mucoadhesivas diseñadas como monocapa o multicapa y las matrices de microagujas siendo las sólidas y las solubles la que serán vistas en detalle a lo largo de esta recopilación. Junto con el avance de estas formas farmacéuticas, se han desarrollado diferentes estrategias para lograr una mucopenetración efectiva como lo es por ejemplo a través de la funcionalización de nanovehículos. El conjunto de elementos claves como la vía de administración y la capacidad de la formulación para inducir una respuesta inmune efectiva, pueden ser capaces de otorgar grandes beneficios siendo posible lograr respuestas que generen una memoria más duradera.

Palabras clave: Inmunidad mucosal, vacunas bucales, vacunas sublinguales, adyuvantes, sistemas de entrega de antígenos.

## Summary

Currently, most vaccines available on the market are for parental use; however, this may not be the best option on several occasions. Mucosal routes of administration such as intranasal, sublingual, and buccal generate great interest due to the benefits they offer. These range from increasing patient compliance to inducing a more effective immune response than that achieved through conventional routes. Due to the activation of the common mucosal immune system, it is possible to generate an effective systemic and local immune response, which is not achieved through parenteral administration. Protection against pathogens that use mucosal entry routes is provided by an effective induction of mucosal immunity. Mucosal delivery systems are being developed, such as films and microneedles, which have proven to be effective, safe, and easy to administer. These systems have multiple advantages over commonly used injections, which are simple to manufacture, stable at room temperature, painless for the patient since they do not require puncture. Therefore, these delivery systems do not require to be administered by medical personnel; in fact, they could be self-administered. This bibliographical report presents a compilation of research in which biological delivery systems are developed. Among the most relevant are mucoadhesive films designed as monolayer or multilayer and microneedle arrays. Solid and soluble microneedles will be seen in detail throughout this compilation. Along with the progress of these pharmaceutical forms, different strategies have been developed to achieve effective mucopenetration, such as nanocarriers functionalization. The set of key elements such as the route of administration and the ability of the formulation to induce an effective immune response may be capable of granting great benefits, being possible to achieve responses that generate a longer lasting memory.

Key words: mucosal immunity, buccal vaccines, sublingual vaccines, adjuvants, antigen delivery systems.

## Introducción

En su gran mayoría, los patógenos que generan infecciones sistémicas, y en algunos casos de carácter crónico, son capaces de entrar al organismo a través de las mucosas. Hoy en día las principales vías de administración de vacunas son a través de la vía subcutánea e intramuscular [1, 2]. Si bien estas vías son ampliamente conocidas y estudiadas, pueden no ser la mejor opción para lograr una protección suficiente frente a la invasión de patógenos ya que generalmente no se observa la inducción de una respuesta inmune mucosal efectiva [3, 4]. Con el objetivo de frenar una posible infección en el sitio donde ocurre la exposición, es necesario contar con un sistema de defensa adecuado. Esto es posible de lograr gracias a la inmunización a través de la vía mucosal.

El sistema inmune mucosal es una compleja red que integra los sitios mucosales presentes en el tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital, originando así, el sistema inmune común de las mucosas. Este sistema común puede llegar a compartir sus mecanismos de defensa entre los distintos sitios a lo largo del organismo, lo cual abre la posibilidad de presentar un antígeno en un sitio específico para luego obtener una respuesta inmune en un tejido distante además del original [4, 5]. Una vacuna en una formulación administrada a través de la mucosa puede ser capaz de inducir ambas fracciones del sistema inmune; local y sistémico [3, 6]. A diferencia de las vacunas administradas por vías parenterales las cuales en su gran mayoría solo efectúan respuestas eficientes a nivel sistémico.

La entrega de vacunas por vía mucosal puede proporcionar múltiples beneficios al compararlas con las vacunas parenterales, ya sea en temas de eficacia, seguridad, logística, comodidad para el paciente e incluso en términos de costo-efectividad [7, 8]. En esta memoria se realizó una revisión bibliográfica de los aspectos más relevantes de la inmunización mucosal, en donde se consideran aspectos de la fisiología del sistema inmune mucosal, las vías de administración más utilizadas además de las formas farmacéuticas en desarrollo detallando sus estructuras y componentes tales como antígenos y adyuvantes utilizados. Esta revisión bibliográfica fue publicada durante 2021 bajo el título de “Buccal and Sublingual Vaccines: A Review on Oral Mucosal Immunization and Delivery Systems” en la revista Vaccines [9].

## **Objetivo general**

Realizar una revisión bibliográfica sobre los factores claves en la inmunización a través de la mucosa oral, entregando además una base sobre las funciones del sistema inmune mucosal principalmente y las distintas formas farmacéuticas que hacen posible la inmunización a través de esta vía no convencional.

## **Objetivos específicos**

1. Introducir las diferentes vías de administración utilizadas para inmunizar, realizando una breve comparación entre ellas.
2. Describir las funciones y estructuras más importantes que componen el sistema inmune mucosal. Incorporar detalles sobre la calidad de las respuestas inmunes inducidas a través de estas vías comparándolas con las vías parenterales.
3. Presentar las formas farmacéuticas y vehículos utilizados en el desarrollo de formulaciones mucosales.
4. Entregar información detallada sobre las principales formas farmacéuticas ya mencionadas; las películas bucales y las matrices de microagujas. Indicando los principales métodos de fabricación e ilustrando sus estructuras principales.
5. Revisar los adyuvantes mucosales más utilizados entregando información acerca de los aspectos más importantes de cada adyuvante mencionado sobre su seguridad y eficacia.

## Metodología

Durante el trabajo preliminar al desarrollo de la escritura de la revisión, fue necesario realizar una amplia búsqueda de artículos para luego seleccionar los que serían incluidos en el texto final. Esta recopilación se realizó principalmente a través de la plataforma Web of Science [10] en la cual se realizaron numerosas búsquedas desde lo más amplio hasta los temas más específicos. Dentro de la plataforma es posible dirigir la búsqueda de documentos según campos (título, tópico, abstract, entre otros) siendo posible también la inclusión de todos estos para obtener una mayor diversidad de resultados.

En la búsqueda inicial se indagó por documentos, específicamente artículos de investigación, los cuales mencionaran las palabras truncadas *immun\** o *vaccin\** donde el asterisco abarca cualquier terminación de la palabra como por ejemplo *vaccine*, *vaccination*, *vaccinated* y que en los tópicos se mencionara *buccal* u *oral\** o *sublingual*. Al realizar esta búsqueda se obtuvo un resultado de 438 artículos, por lo que se decidió realizar búsquedas más específicas y dirigidas dado al gran volumen de artículos encontrados en la plataforma. Las búsquedas siguientes incluyeron los siguientes conceptos claves: *vaccin\**, *immun\**, *buccal*, *sublingual*, *oral\**, *oral mucosa*, *buccal mucosa* y *adjuvant*. Para refinar las búsquedas se filtró por tipo de documento, artículo o revisión.

En total, se realizaron 20 búsquedas aproximadamente. De estas búsquedas se eliminaron los documentos duplicados y se realizó una primera selección de artículos. Esta selección fue basada en la relevancia del artículo y/o revisión en cuanto a los márgenes definidos para la elaboración de esta revisión. En este aspecto, se considera la vía bucal como vía principal, la administración de antígenos, las respuestas inmunes generadas y formas farmacéuticas innovadoras que sean administradas por vías mucosales principalmente. Esta primera selección quedó compuesta por 223 documentos.

Finalmente al analizar en detalle cada documento, se realizó una selección final para ser incorporados a la revisión. Se excluyeron en su mayoría las investigaciones en donde la mucosa gastrointestinal y nasal fueron los tejidos principales de investigación a excepción de las investigaciones que incluían la mucosa bucal a modo de comparación.

## 1. Rutas de inmunización mucosal

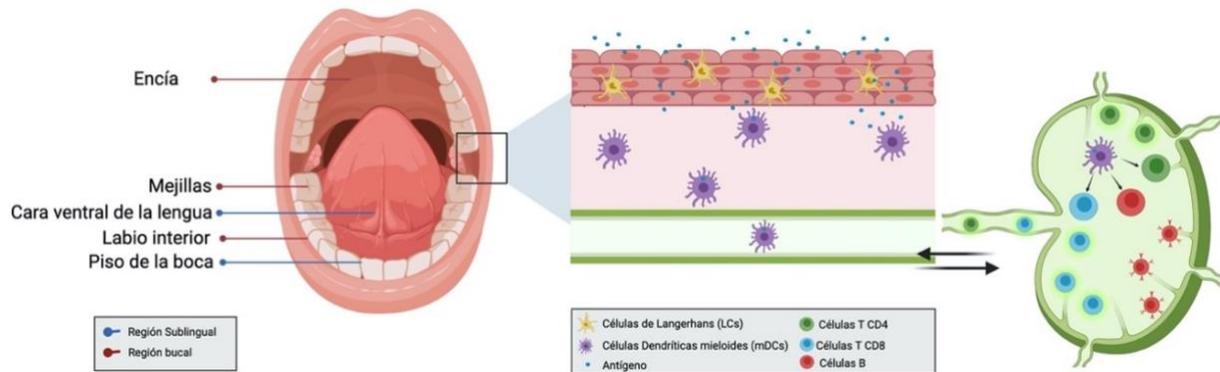
La cavidad oral es una de las vías de administración más ampliamente aceptadas y amigables con el paciente para la administración de una gran variedad de fármacos. La cavidad oral incluye las áreas gingivales, las áreas ventrales y dorsales de la lengua, las mejillas, la zona interna de los labios y el suelo de la boca (Figura 1). La cavidad oral permite el acceso a distintas rutas de administración de medicamentos, la más utilizada es la ruta que incluye el tracto gastrointestinal en donde el fármaco pasa a través del esófago hacia el estómago y luego es absorbido principalmente en el intestino. Por otro lado, existen las vías sublinguales y bucales que se enfocan únicamente en la boca, por lo tanto, no incluyen otros sitios del tracto gastrointestinal. En consecuencia, a través de la cavidad oral es posible tener acceso a la vía sublingual, bucal, oral e intragástrica. Siendo la vía oral la más utilizada para pacientes ambulatorios ya que es segura, fácil de usar, económica e indolora para los pacientes. Esto puede ayudar a mejorar el cumplimiento por parte de los pacientes, lo cual es muy importante, particularmente en situaciones en las que una gran parte de la población necesita adquirir inmunidad contra ciertos patógenos a través de la vacunación. Por otro lado, en ocasiones particulares, es necesario evitar la vía oral debido a la alta actividad enzimática y los niveles de pH presentes en esta. Debido a que los ambientes ácidos pueden ser perjudiciales para la estabilidad de ciertas moléculas [11, 12], destruyéndolas inmediatamente al entrar en contacto con los ácidos gástricos. Además, la administración sublingual y bucal son capaces de evadir la circulación enterohepática y, por tanto, el efecto de primer paso resultante del metabolismo hepático [13]. Por tanto, utilizando las vías sublingual y bucal, es posible sortear estos obstáculos. En la tabla 1 se muestra un resumen de las principales características de las vías de administración mencionadas. Estas rutas han adquirido un creciente interés para la administración de un amplio grupo de moléculas principalmente las de naturaleza peptídica. Existen numerosos péptidos y proteínas que se utilizan con fines terapéuticos, ya sea para tratar una enfermedad o para prevenirla. Dentro de la cavidad oral, hay dos sitios principales de liberación de la mucosa, las áreas sublingual y bucal. Estas regiones, debido a su epitelio estratificado y no queratinizado, dan como resultado un tejido más elástico y permeable que otras regiones de la boca, ayudando así a la absorción del fármaco. Mientras que el paladar y las zonas gingivales están revestidas con epitelio estratificado queratinizado, lo que las hace más difíciles de penetrar. Estas características convierten a las regiones sublingual y bucal en rutas viables para la administración de fármacos, para moléculas pequeñas y para

vacunas ya que el sistema inmunológico asociado a las mucosas es altamente desarrollado [14].

**Tabla 1.** Comparación entre rutas de administración.

Vía de administración	Ventaja	Desventaja	Referencia
Subcutánea	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absorción asegurada</li> <li>• Evita el efecto de primer paso</li> <li>• Induce respuestas inmune sistémicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dolor en el sitio de punción</li> <li>• Requiere personal médico</li> <li>• No induce respuestas inmunitarias mucosales efectivas</li> </ul>	[15] [8]
Intramuscular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absorción asegurada</li> <li>• Evita el efecto de primer paso</li> <li>• Induce respuestas inmune sistémicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dolor en el sitio de punción</li> <li>• Requiere personal médico</li> <li>• Requiere cadena de frío</li> <li>• Fabricación costosa</li> <li>• No induce respuestas inmunitarias mucosales efectivas</li> </ul>	[16] [8]
Oral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indoloro</li> <li>• Fácil de administrar</li> <li>• Induce respuestas inmunes sistémicas y mucosales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disgeusia</li> <li>• Degradación de la vacuna por el agresivo ambiente estomacal y alta actividad enzimática</li> </ul>	[17] [8]
Bucal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indoloro</li> <li>• Fácil de administrar</li> <li>• Niveles de pH moderados</li> <li>• Induce respuestas inmunes sistémicas y mucosales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disgeusia</li> <li>• Estrés por movimiento</li> <li>• Dilución de la vacuna por lavado salival</li> </ul>	[15, 18] [8]
Sublingual	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indoloro</li> <li>• Fácil de administrar</li> <li>• Induce respuestas inmunes sistémicas y mucosales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disgeusia</li> <li>• Estrés por movimiento</li> <li>• Dilución de la vacuna por lavado salival</li> </ul>	[8, 19]
Intranasal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indoloro</li> <li>• Induce respuestas inmunes sistémicas y mucosales</li> <li>• Niveles de pH moderados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiempo de residencia corto</li> <li>• Paso retrógrado hacia el sistema nervioso central</li> <li>• Rápida eliminación de antígenos</li> </ul>	[4–6, 16, 20]

**Figura 1.** Captación y presentación de antígenos por las células dendríticas a través de la vía de la mucosa oral para la inmunización.



## 2. Sistema inmune mucosal

Las membranas mucosales constituyen una gran e importante barrera que protege al organismo de amenazas del exterior. Representan la primera línea de defensa contra virus, bacterias y hongos, generando así una interacción importante entre el cuerpo y el medio externo [21].

De hecho, aproximadamente la mitad de los linfocitos se encuentran en los tejidos linfoides asociados a las mucosas [22]. Estudios en ratones han demostrado que la vacunación mucosal contra *Helicobacter pylori* puede reducir significativamente la colonización bacteriana en el estómago de ratones infectados después de la vacunación [3], demostrando la eficacia y viabilidad de utilizar la vía mucosal como vía de administración de antígenos. Además, la administración de antígenos a través de la mucosa puede inducir inmunidad local y también sistémica. Efectivamente, algunas respuestas inmunitarias de las mucosas parecen ser mejores cuando la vacuna se administra en las superficies de las mucosas en lugar de las que han sido administradas a través de la vía parenteral [4, 23, 24]. Dado que la vía parenteral no es capaz de inducir una inmunidad mucosal eficaz, la vacunación a través de las vías mucosales sería una mejor opción para alcanzar una protección eficaz contra los patógenos. Para lograr una administración exitosa de la vacuna hacia la mucosa, se requiere una estrategia de permeación del mucus, la funcionalización de nanovehículos ofrece grandes ventajas a la hora de mejorar el rendimiento de la formulación y apuntar a la mucosa. Los mecanismos generalmente utilizados por los patógenos para facilitar su entrada al organismo son; la alteración del ensamblaje de la mucina, la degradación y la ruptura de la barrera mucosal [25]. La funcionalización usando lectinas, glicoconjugados y ligandos microbianos como lipopolisacárido y flagelina ha sido una de las formas de superar el desafío de atravesar dicha barrera. Se ha demostrado a

través de varios estudios que el enfoque de imitación de microorganismos puede llegar a inducir respuestas inmunes mejoradas [25–27].

Esto demuestra la relevancia de poder generar una respuesta inmune eficaz a nivel de las diferentes mucosas del organismo para hacer frente a las infecciones que se transmiten por esta vía y atacar a los patógenos a tiempo, con la finalidad de prevenir una posible infección y con ella la enfermedad que se desencadena.

## **2.1 Clasificación de tejidos linfoides asociados a mucosas**

MALT (por su nombre en inglés *Mucosa-associated lymphoid tissue*) es el tejido linfoide asociado a la mucosa y es capaz de iniciar una respuesta inmune contra antígenos específicos presentes en la superficie de la mucosa [28]. La función principal del MALT es producir y secretar anticuerpos IgA específicos para antígenos a lo largo de la superficie de la mucosa [29]. MALT comprende el sistema inmunológico relacionado con la mucosa, que puede funcionar de manera independiente del sistema inmunológico sistémico [29]. Este tejido se subclasifica según su ubicación, el tejido linfoide asociado a la nasofaringe NALT (por su nombre en inglés *Nasopharynx-associated lymphoid tissue*), el tejido linfoide asociado al intestino GALT (por su nombre en inglés *Gut-associated lymphoid tissue*), el tejido linfoide asociado a los bronquios BALT (por su nombre en inglés *Bronchus-associated lymphoid tissue*) y el tejido linfoide asociado al sistema urogenital [28, 29]. Entre los sitios inductivos que se encuentran en el sistema inmunológico de las mucosas, las células M o microfold cumplen un rol fundamental. Las células M se encuentran principalmente en el epitelio perteneciente a GALT y NALT. Dentro de este rol en la inmunización, se han realizado estudios para apuntar a las células M utilizando lipopolisacárido [30], FimH [31] y la proteína de reconocimiento de peptidoglicano-1 [32]. Este uso de ligandos dirigidos a células M ha llevado a una mejora de las respuestas inmunitarias sistémicas y mucosales [33].

Con respecto a los componentes de MALT, NALT es uno de los componentes principales y puede inducir respuestas inmunes contra antígenos específicos [34]. Se ha demostrado que los tejidos linfoides asociados a la vía oral, especialmente el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT), parecen ser importantes para la activación de las células T tras la exposición al antígeno. De hecho, NALT es uno de los primeros sitios que exhiben activación de células T siendo esta independiente de la vía de administración [35]. Por lo tanto, NALT es uno de los principales objetivos de la vacunación a través de mucosas para

inducir la protección inmunitaria en la vía respiratoria y para combatir las enfermedades infecciosas que afectan las mucosas [36, 37]. A pesar de que los diferentes tejidos linfoides están separados según su ubicación, estos pueden permanecer conectados y comunicados a través del sistema inmune común de las mucosas (SICM). Esto implica que los linfocitos inducidos por un antígeno específico en un sitio de la mucosa pueden migrar a un sitio distante de la mucosa como células efectoras para proteger los tejidos del mismo antígeno en otros órganos [29, 37–40]. Aunque existe comunicación entre los tejidos de las mucosas, no son iguales en términos de inducción de respuestas inmunes. Por ejemplo, la vacunación intranasal se dirige a los tractos respiratorio, gástrico y genital, mientras que la vía oral es eficaz para inducir inmunidad en el intestino y el tejido mamario, mientras que la inmunización rectal es útil para inducir la inmunidad rectal y del colon e incluso puede conferir inmunidad al tracto genital [41]. Esto ofrece la posibilidad de llegar a sitios de difícil acceso a través de rutas convencionales. Así es como resulta posible administrar antígenos en un sitio de la mucosa que sea fácilmente accesible, para eventualmente inducir respuestas inmunes en las membranas mucosales distantes del sitio de administración [42].

## **2.2 Comparación entre la vía parenteral; Inmunidad local versus sistémica.**

Actualmente, las vías más utilizadas para la administración de antígenos son las vías parenterales, que son accesibles y eficaces para inducir respuestas inmunitarias sistémicas. La eficacia de las vías de las mucosas para conseguir una respuesta inmunitaria capaz de proteger al organismo ha sido demostrada en una amplia variedad de estudios. Estas vías se han comparado con otras, habitualmente vías parenterales, ya que son las más utilizadas. Se sabe que es posible reducir significativamente la transmisión de patógenos de las mucosas mediante la administración de vacunas en los potenciales sitios de entrada de microorganismos. Esto se debe a la capacidad de generar respuestas humorales y celulares en el sitio de vacunación [23, 42]. A través de la inmunización de la mucosa, es posible inducir respuestas inmunitarias celulares y de anticuerpos sistémicos, así como respuestas de células T CD8 + citotóxicas de la mucosa (Figura 1) [4, 43, 44]. De manera similar a las vías parenterales, la administración a través de las mucosas ha demostrado tener una eficacia comparable. Para la inmunización contra el virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS) a través de aerosol se mostró una fuerte inducción de respuestas celulares en los pulmones y la inmunidad humoral sistémica se volvió tan efectiva como la intramuscular [45]. Además, el hecho de dirigirse a los sitios de la mucosa

del tracto respiratorio podría desarrollar respuestas de células T de las mucosas más robustas que las alcanzadas a través de una administración intramuscular [46–49]. Un factor clave para generar esta respuesta es la inducción de respuestas inmunitarias específicas en el sitio de la mucosa que está expuesto a la amenaza para interrumpir la infección. Hay casos en los que las vacunas mucosales han mostrado una mayor eficacia en comparación con las mismas vacunas administradas por vía parenteral. En un estudio realizado en niños, se observó la eficacia de la vacuna contra la influenza la cual fue administrada por dos vías, intranasal (vacuna de virus atenuado) e intramuscular (vacuna de virus inactivado). Los resultados mostraron que la vía intranasal resultó demostrar una mejor inmunidad protectora que en los casos en los que se administró por vía intramuscular [16]. Se ha observado también que, la eficacia de la inmunización está estrechamente relacionada con el tipo de infección a la que se dirige, por ejemplo, para la protección frente a patógenos que actúan en áreas mucosales como el virus de la influenza, el rotavirus y el virus del papiloma humano, se requiere la presencia de anticuerpos en los sitios de entrada de estos patógenos. Es posible lograr una inducción de estos anticuerpos mediante la inmunización de la mucosa, la cual genera principalmente anticuerpos IgA, o mediante la trasudación de anticuerpos IgG del suero generado a través de las vías de inmunización convencional [50, 51]. Para las infecciones en las que la protección inmunitaria está mediada principalmente por los componentes de la mucosa local, existe impermeabilidad frente a la trasudación de anticuerpos séricos o al paso pasivo a través del epitelio. En este caso, parecería más apropiado utilizar una vía de administración tópica mucosal [23].

La vía bucal para la administración de antígenos ha generado un interés considerable, dado que la mucosa oral tiene una gran cantidad de células dendríticas y células de Langerhans, lo cual es relevante para lograr respuestas inmunes efectivas (Figura 1). Se han publicado varios estudios que demuestran la eficacia de la vía bucal, en los cuales se ha observado que la vía de administración bucal es capaz de inducir inmunidad antitumoral sistémica utilizando una vacuna contra el melanoma en un modelo de hámster [52]. Existen estudios en los que se han utilizado películas que se desintegran oralmente las cuales contienen micropartículas de la vacuna, aumentando significativamente la presentación de antígenos y los títulos de anticuerpos en el modelo porcino juvenil. De esta forma, se genera una respuesta inmunitaria eficaz a través de la mucosa bucal [18].

Además, se demostró que la mucosa oral establece una inmunidad antitumoral sistémica incluso más eficaz que la inmunización cutánea [52], y demostró una eficacia satisfactoria

para las lesiones cutáneas distantes. Otro estudio realizado en ratones demostró que al administrar pDNA mediante inyección jet intraoral en la mejilla, la respuesta inmune de la mucosa se logró induciendo la producción de anticuerpos IgA [17]. El mecanismo de infección del patógeno del que se pretende proteger debe ser considerado al momento de elegir la ruta de inmunización, ya que es posible lograr diferentes respuestas a través de diferentes rutas utilizando el mismo antígeno. Un tema importante es la persistencia de la protección, donde la memoria de las células T es la principal responsable en el caso de una segunda exposición al antígeno, ya que genera la respuesta más rápida [53–56]. Además de lo anterior, la primera zona de exposición al antígeno es relevante ya que influirá en la permanencia de la memoria de las células T. Se ha visto que la recirculación de linfocitos de memoria activados es selectiva y dependerá del tejido y de los ganglios linfáticos en donde se originaron los linfocitos durante la primera exposición. Sin embargo, en el caso de la memoria a corto plazo de los linfocitos T citotóxicos de la mucosa no se ve influida por la vía de administración [57]. Esto es diferente de los linfocitos activados recientemente derivados de los tejidos de las mucosas o la piel porque han mostrado una preferencia por migrar de regreso a los sitios donde ocurrió la primera exposición al antígeno [57–60]. Sin embargo, la inmunización intranasal podría resultar en una memoria de linfocitos T citotóxicos a largo plazo en la mucosa local del tracto respiratorio, pero también en tejidos distantes como el tracto genital [4]. Lo anterior daría cuenta de que el tracto genital es un sitio efector implícito dentro del sistema inmunológico de la mucosa común. Se ha demostrado que, en el caso de respuestas a largo plazo, cuando la administración es a través de la mucosa nasal, la memoria mucosa es duradera mientras que la memoria sistémica es corta. A diferencia de la inmunización parenteral, donde la memoria generada a nivel mucosal tiende a ser corta y mientras que la memoria sistémica generada suele ser duradera [4]. Utilizando la vía sublingual para administrar vacunas, incluso es posible lograr respuestas inmunitarias a largo plazo mediante la inducción eficaz de células plasmáticas de larga vida para un antígeno específico [19]. Cuando la respuesta inmune generada se debe únicamente a la participación de la mucosa sublingual y cuando se administra la misma dosis por vía oral, esta respuesta no se observa [19].

### **2.3 Inducción de respuestas inmunes efectivas en sitios distantes del sitio de administración**

El hecho de que las mucosas mantengan comunicación entre sí a pesar de estar físicamente distantes es interesante cuando se considera la administración de antígenos que requieren su acción en sitios distantes. En un estudio realizado en ratones, se administró una vacuna de la subunidad del VIH por vía intranasal, sublingual e intravaginal. En el cual la vía intravaginal resultó ser eficaz en la inducción de anticuerpos en el área de la mucosa genital [5]. De hecho, es posible lograr respuestas humorales distales en la mucosa vaginal y rectal debido a la orientación hacia los sitios de la mucosa ubicados en el tracto respiratorio [45]. Sin embargo, la eficacia de la inmunización está muy influenciada por las fluctuaciones hormonales del individuo [5]. Al respecto, se ha visto que el estradiol es responsable de la variabilidad en la eficacia de la vía intravaginal ya que se ha observado que inhibe el cebado de células T CD8+ [61]. Además, tanto la vía intravaginal como la intrarectal, a pesar de ser eficaces para inducir una respuesta inmunitaria, tienen un escaso cumplimiento por parte del paciente [23].

Como alternativas a la vía intravaginal, se probaron las vías sublingual e intranasal, ya que se encontró que poseían una efectividad similar. Sin embargo, la vía intranasal ha generado ciertas alertas sobre su seguridad ya que se han reportado efectos adversos no deseados relacionados con daños al sistema nervioso central. Entre estas complicaciones, la translocación de adenovirus al bulbo olfatorio en ratones y la parálisis de Bell se han descrito en voluntarios que han sido inmunizados contra el virus de la influenza por vía intranasal [62]. Además, se ha informado de que la administración de cierto tipo de enterotoxina de *Escherichia coli*, a través de la ruta intranasal en humanos sanos es capaz de producir efectos tóxicos [20]. Se cree que hay un paso retrógrado de los componentes de la formulación hacia el sistema nervioso central después de la unión de los gangliósidos [20], el cual no se observa a través de la vía sublingual [62–68].

### **2.4 Administración sublingual de antígenos como alternativa para el tratamiento de alergias**

La superficie de la mucosa, al ser la primera barrera frente a los patógenos, debe contar con mecanismos de defensa capaces de proteger al organismo del medio externo. Además, es necesario adquirir tolerancia frente a antígenos inhalados o absorbidos por vía oral no

peligrosos y mantener en equilibrio la microbiota local [69]. Sin embargo, cuando estos mecanismos no funcionan correctamente, se pueden presentar alergias a elementos que se presentan de manera común en el medio ambiente, como ocurre con algunos componentes de los alimentos. Las vías mucosales no solo han demostrado ser útiles y eficaces en la protección frente a patógenos, sino que también son interesantes para el tratamiento de determinadas alergias.

Las alergias son un problema que afecta a una parte importante de la población, desde niños pequeños hasta adultos mayores. El alérgeno más común que causa problemas en las vías respiratorias es el polen de pasto [70, 71]. Esta alergia se manifiesta frecuentemente con rinitis o incluso asma y generalmente se trata con antihistamínicos y corticosteroides para controlar los síntomas, pero eso no ataca la causa del problema. Uno de los tratamientos que podría ayudar a solucionarlo es la inmunoterapia específica [72], que puede administrarse por vía subcutánea. Como alternativa a las vías convencionales, se ha propuesto la sublingual ya que la administración de antígenos ha demostrado ser eficaz para suprimir las respuestas de anticuerpos IgG e IgE, esenciales en los tratamientos de alergia [73, 74].

El uso de la vía sublingual propone un tratamiento no invasivo, indoloro y seguro, ya que nunca se han descrito casos mortales asociados con la inmunoterapia sublingual [63]. De hecho, el uso de vías alternativas como la vía sublingual podría volverse más seguro al minimizar el riesgo de inducir anafilaxia durante la terapia [8]. Esto resulta ser una ventaja importante en términos de seguridad de la ruta sublingual sobre otras rutas utilizadas convencionalmente. Además, se demostró que la vía sublingual en la administración de ovoalbúmina (OVA) como alérgeno induce una supresión de anticuerpos IgE más alta que cuando se administra por vía intragástrica [75]. Como se ha demostrado, la vía sublingual como vía de administración de alérgenos podría volverse más segura e incluso más eficaz en algunos casos para el tratamiento específico de alergias.

Como se ha observado en los estudios mostrados anteriormente, la administración de antígenos a través de las vías mucosales puede resultar beneficiosa en varias circunstancias. Podrían ser útiles, por ejemplo, en pacientes pediátricos o geriátricos con dificultad de deglución. Además, en algunos casos, el hecho de administrar los antígenos por vía mucosal se observa en mayor efectividad en el tratamiento en comparación con otras vías comúnmente utilizadas.

### 3. Sistemas de entrega de antígenos y adyuvantes mucosales de uso común

La cavidad oral presenta un gran potencial para la administración de antígenos. Se han desarrollado varias formas de dosificación que utilizan la cavidad oral como lugar de administración a través de; comprimidos [76], películas mucoadhesivas [8, 15, 76–78], geles [79], microagujas [80–83] y MucoJet™ [84] (Tabla 2). Las vías que componen la cavidad oral pueden ser beneficiosas en muchos casos, aumentando el cumplimiento del paciente por su facilidad de administración y permitiendo una inmunización a gran escala. Sin embargo, podría presentar algunas dificultades (Tabla 1). Entre los retos a los que se enfrentan los sistemas de administración se encuentra la necesidad de mantener concentraciones suficientes dentro del área de administración, ya que fisiológicamente existe un lavado debido a la anatomía de la cavidad bucal. El movimiento de las mejillas, la lengua y la cantidad de saliva pueden dificultar la administración y alterar las concentraciones de los fármacos o biológicos administrados. Esto incluso podría desprender la película o tableta que se espera esté adherida al tejido.

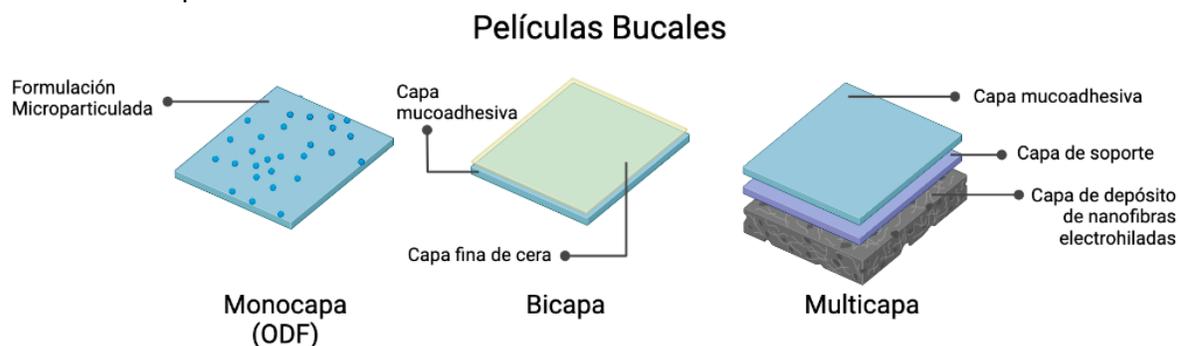
**Tabla 2.** Características de sistemas de entrega de antígenos.

Forma de dosificación	Vía de administración	Característica principal	Antígeno/ modelo utilizado	Referencia
Película	Bucal	Película de desintegración oral cargada con vacuna microparticulada	Vacuna viva atenuada microparticulada contra el sarampión	[18]
		Película mucoadhesiva en bicapa	$\beta$ -galactosidasa / ADN plasmídico que expresa $\beta$ -galactosidasa	[15]
		Película multicapa de depósito nanofibroso electrohilado	Nanopartículas y liposomas cargados con proteína fluorescente verde	[77]
Microagujas	Labio inferior/ Lengua	Matriz de microagujas sólidas de acero inoxidable con recubrimiento	Antígenos de VIH y Ovoalbúmina	[80]
	Bucal	Matriz de microagujas sólidas de ácido poliláctico cubierta de carboximetilcelulosa	Ovoalbúmina	[81]
	Mucosa oral	Matriz de microagujas solubles cargadas con liposomas	Albumina de suero bovino	[82]

### 3.1 Películas

Como se mencionó anteriormente, la cavidad oral es un sitio de gran interés para la administración de antígenos. La inmunización en su gran mayoría consiste en una administración a través de una inyección, principalmente intramuscular o subcutánea, que en muchas ocasiones puede dificultar el proceso. A través de la cavidad bucal, es posible administrar una amplia variedad de formas de dosificación, incluidas las películas. Aunque la vía bucal y sublingual presentan algunas desventajas, como el estrés por movimiento o el lavado salival, ciertas propiedades de las películas pueden superar estos obstáculos. La principal característica de las películas mucoadhesivas es poder permanecer en la superficie de la cavidad bucal el tiempo suficiente para liberar el contenido en la mucosa bucal. Existen varios métodos para fabricar películas; dentro de estos, el más simple es el método de evaporación de disolvente. En este procedimiento, el principio activo se puede incorporar a la solución de gel y luego, cuando se seca, se forma una película que contiene el antígeno en su interior, también existe la posibilidad de cargar la película al final del proceso de fabricación. El desarrollo de películas bucales ha permitido la elaboración de películas en bicapas o multicapas; de esta forma, puede haber capas con diferentes funciones, optimizando así el sistema de entrega.

**Figura 2.** Diferentes tipos de sistemas de película de liberación de mucosa oral y cada una de sus capas.



Con respecto a la fabricación de películas monocapa, las películas de desintegración oral ODF (por su nombre en inglés *orally disintegrating film*) han demostrado ser de gran interés. No solo en la aplicación de una amplia variedad de fármacos sino también en la entrega de vacunas a través de la cavidad bucal. Este tipo de película se disuelve rápidamente cuando entra en contacto con la saliva, por lo que es cómoda para el paciente y reduce el riesgo de atragantamiento. Un grupo de investigadores fabricó una nueva vacuna oral contra el sarampión [18], la cual consiste en una película de disolución oral, donde la vacuna a administrar se incorpora a la película en forma de micropartículas fabricadas por secado

por atomización. Los componentes del gel que formarán la película, Lycoat RS720®, Neosorb P60W® y Tween 80 darán como resultado una matriz polimérica entérica (Figura 2). Una de las ventajas que tiene esta matriz es la de optimizar la absorción de las partículas ingeridas que no fueron absorbidas en la cavidad bucal. Dado que tienen las características para llegar al intestino en buenas condiciones donde podrían generar una respuesta inmune adicional, en este estudio se realizaron pruebas de inmunidad *in vivo* utilizando el modelo de porcino juvenil. Este modelo resulta ser bastante preciso ya que la mucosa porcina presenta semejanzas con la mucosa humana en cuanto a su composición y estructura [85]. Se administró una dosis inicial utilizando una película de desintegración oral y luego, después de dos semanas se administró una dosis de refuerzo en donde se observó que esta formulación es capaz de inducir una respuesta inmune significativa. En este caso, la presentación de antígenos al complejo mayor de histocompatibilidad clases I y II (CMH I y CMH II) aumentó, en comparación con la formulación que no contenía la vacuna. Además, se observaron títulos de anticuerpos incluso más altos en las semanas cuatro y seis, en comparación con los niveles previos a la inmunización [18].

Respecto a las películas compuestas por bicapa, Cui y Mumper [5] realizaron una investigación donde la formulación de las películas mucoadhesivas estaba compuesta por dos capas. Una fina capa de cera y otra capa mucoadhesiva que contiene el antígeno en el interior o en la superficie (Figura 2). La capa mucoadhesiva se fabricó usando una mezcla de dos polímeros, Noveon AA-1, un polímero de poliácido mucoadhesivo reticulado, y Eudragit S-100, un copolímero aniónico sensible al pH de ácido polimetacrílico-co-metacrilato de metilo. Brevemente, el método de fabricación de las películas consiste en preparar un gel a base de etanol y luego secarlo para formar la película. Finalmente, un lado de la película se sumerge en cera fundida para darle una segunda capa que se cree que ayuda a retardar la difusión. Aunque esta variable no ha sido estudiada en esta investigación. Se utilizó  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa que expresa ADN plasmídico como modelo de antígeno proteico. En cuanto a la carga del antígeno, se utilizaron dos métodos. La precarga donde se colocó el antígeno sobre el gel antes de secarlo y la post-carga, donde se cargó el antígeno una vez que ya se había formado la película. Este último mostró la mejor liberación, 60% en 2 horas para pDNA y 80% para  $\beta$ -galactosidasa. A partir de este estudio, se encontró que existe una proporción óptima para lograr una mayor mucoadherencia, donde la composición fue 3:1 de Noveon/Eudragit. Además de investigar la proporción de polímeros para lograr una buena mucoadhesión, se realizaron *pruebas in vivo* en conejos para evaluar las respuestas inmunes. Al analizar los resultados de la

inmunización de la mucosa en comparación con la inmunización subcutánea en conejos, se demostró que era posible inducir IgG específica de antígeno a través de películas mucoadhesivas. Al cabo de 28 días de la inmunización, los títulos de IgG fueron significativamente mayores en los conejos inmunizados por vía bucal en comparación con la vía subcutánea. Además, fue posible demostrar que los conejos que fueron inmunizados con películas de bicapa bucal que contienen pDNA desarrollaron signos de inmunidad celular ya que fue posible observar respuestas proliferativas positivas de esplenocitos [15].

El desarrollo de películas bucales y sublinguales ha permitido fabricar películas con tres o incluso más capas, a las que se les pueden atribuir diferentes características para lograr una administración exitosa. Debido a la tecnología detrás de estos sistemas multicapa, la liberación y entrega del antígeno se puede controlar para mantener un gradiente de concentración a largo plazo, evitando que sea eliminado rápidamente por la saliva. Además, la incorporación de una capa de soporte impermeable, como en el caso anterior de las películas con bicapa, permite que el movimiento del contenido de la película sea unidireccional, ya que el lado que entra en contacto con el resto de la cavidad bucal no es capaz de liberar el contenido de la película. Para obtener una gran relación superficie-peso, se han combinado las tecnologías de las ventajas de las multicapas, nanopartículas y nanofibras [77]. Mašek y col. fabricaron películas multicapa para la vacunación a través de la administración de nanopartículas; estos sistemas de administración constaban de tres capas, una capa mucoadhesiva, una de respaldo y una capa de depósito nanofibrosa electrohilada (Figura 2). Se preparó la capa mucoadhesiva, la cual se cubrió con Eudragit L 100-55 para formar la capa de respaldo. Finalmente, se humedeció la superficie de la capa mucoadhesiva y se presionó contra la capa del reservorio nanofibroso para lograr su adhesión. Cada una de estas capas cumple una función necesaria para lograr una adecuada administración. La capa mucoadhesiva, es necesaria para fijar la película sobre la mucosa oral y permitir que permanezca adherida el tiempo que sea necesario. La función de la capa de soporte de disolución oral es proteger la integridad de la película mucoadhesiva y para la comodidad del paciente, ya que no es necesario retirarla. Finalmente, la capa de nanofibras tiene una tecnología y estructura más compleja que las otras dos capas por lo que la liberación de su contenido dependerá de los materiales utilizados en la formulación, haciéndola más rápida o controlada. Debido a su altísima superficie y a los canales formados entre las fibras, que le confieren una alta porosidad, puede almacenar una gran cantidad de contenido. Estas diferencias significan que tiene

ventajas sobre las capas compuestas por otros materiales como los geles secos; al ser más simples, se reduce su capacidad de almacenamiento. Las capas de nanofibras se realizaron con tres materiales biocompatibles diferentes; Fibroína de seda (FS), Quitosano-Óxido de polietileno (Quitosano-PEO), Policaprolactona (PCL). Donde uno de los factores más importantes a estudiar para esta capa es el grado de adhesividad del material que tiene que ver con la hidrofilia de las capas. Generalmente, materiales como quitosano-PEO, FS y PCL pretratados con NaOH pueden proporcionar una alta hidrofilia, que está relacionada con la capacidad de liberación de nanopartículas. Se ha observado que las películas con superficies hidrófilas fueron capaces de liberar prácticamente todo el contenido necesario durante el tiempo de incubación. Además, se fabricaron liposomas y nanopartículas con marcadores fluorescentes que posteriormente se incorporaron a la capa nanofibrosa. Se realizaron estudios *ex vivo* en mucosa oral porcina donde se compararon formulaciones multicapa con nanopartículas libres. Se ha demostrado que las películas pueden mantener su fluorescencia durante un tiempo prolongado en el lugar de administración, mientras que las nanopartículas libres se eliminaron rápidamente de la superficie de la mucosa y no pudieron penetrar a través de ella. Además, se llevaron a cabo estudios *in vivo* en porcinos jóvenes a los que se les aplicó una película mucoadhesiva multicapa a la mucosa sublingual. La capa de nanofibras era FS, y el contenido de estas películas eran nanopartículas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) y polietilenglicol (PLGA-PEG) marcadas con fluorescencia, en las que PEG cumple la función de proporcionar a las partículas características de penetración de la mucosa [86]. Al analizar los resultados, se encontró la presencia de nanopartículas fluorescentes en las células presentadoras de antígeno porcino (pCPA) en los ganglios linfáticos. Por lo tanto, este sistema de liberación es interesante para la inmunización oral o sublingual debido a su potencial para mantener altas concentraciones a nivel del sitio de administración, además de atravesar la mucosa oral, llegando a sitios de interés como los ganglios linfáticos.

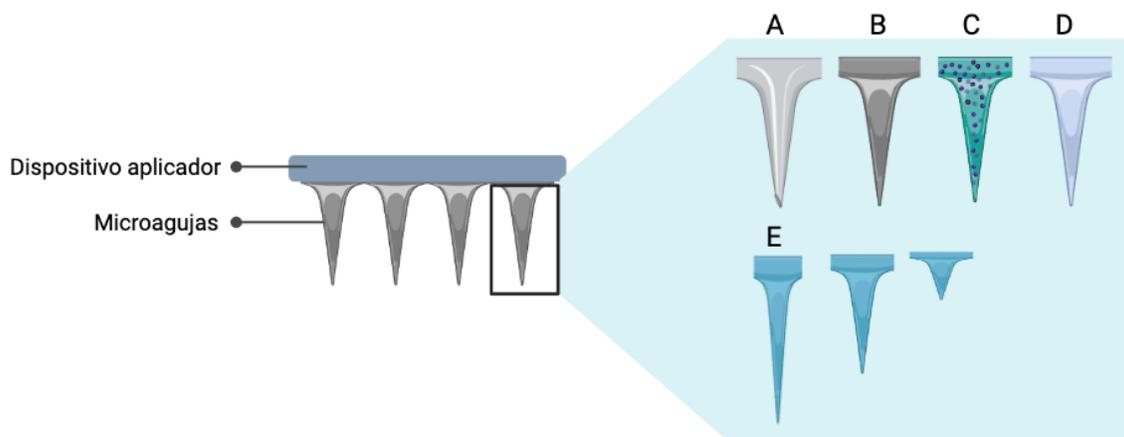
Las películas mucoadhesivas son una plataforma versátil para la administración de fármacos de diferentes formas, incluidos los sistemas biológicos y particulados. También es posible modificar las características de las películas y así lograr el control de la liberación del sistema de entrega. Su complejidad de fabricación dependerá del método utilizado; la dificultad de elaboración puede ir desde la deshidratación de un gel hasta la fabricación de un sistema de nanofibras electrohiladas. Las películas tienen la gran ventaja de que pueden ser modificables en cuanto a estructura, composición, tamaño, hidrofiliidad, espesor, mucoadhesividad, solubilidad, entre otros. Todas estas características hacen que las

películas sean sistemas de administración de fármacos de gran interés en el campo de la vacunación a través de mucosas.

### 3.2 Matriz de microagujas

Las microagujas se han estudiado ampliamente para la administración de vacunas por vía intradérmica; sin embargo, los estudios que involucran la cavidad bucal son limitados. Al igual que las películas, los sistemas de administración de microagujas son indoloros y cómodos para el paciente, fáciles de colocar sin necesidad de personal capacitado, a diferencia de las rutas que requieren punción. Las microagujas también tienen la ventaja de que son muy cambiantes y pueden tener control de varios parámetros cuando se administran como profundidad, uniformidad y dosis a administrar. La geometría de la punta de la microaguja es uno de los parámetros clave a la hora de estudiar su capacidad de penetración cutánea (Figura 3). El afilado y el ángulo de paso de la punta de la microaguja pueden afectar la cantidad de contenido depositado en la piel [87]. También es posible modificar las características de las puntas; pueden ser sólidas, huecas, recubiertas o solubles (Figura 3). En cuanto al contenido, existen formulaciones que incluyen sistemas particulados ya sea como cobertura de las puntas o en el interior en el caso de ser huecas. El contenido de la cobertura de las puntas es altamente modificable.

**Figura 3.** Representación de una variedad de microagujas. La forma, el tamaño y los materiales son modificables. La punta de las microagujas puede ser (A) hueca, (B) sólida, (C) recubierta o (D) soluble. (E) La profundidad puede modificarse a través de la geometría y la punta de las microagujas puede ser (A) hueca, (B) sólida, (C) recubierta o (D) soluble. (E) La profundidad puede modificarse mediante la geometría y el filo de la punta.



Existen varios tipos de compuestos que se han utilizado como cobertura de microagujas, como partículas virales, de bacterias, plásmidos de ADN, etc. [88, 89]. Con respecto al desarrollo de microagujas recubiertas, se ha demostrado que estos sistemas de administración pueden inducir respuestas inmunes cuando se administran en la cavidad oral. Ma et al. [80] fabricaron microagujas recubiertas con tres tipos de antígenos, dos antígenos del VIH y ovoalbúmina. Estas microagujas se administraron en el labio interno y en la superficie dorsal de la lengua de conejos para evaluar la respuesta inmune. La estructura de las microagujas se fabricó a partir de una lámina de acero inoxidable de 50  $\mu\text{m}$  de espesor a la que posteriormente se le colocaron diferentes recubrimientos. La base de la solución de revestimiento se preparó con sal sódica de carboximetilcelulosa y Lutrol F-68 NF, luego se añadió sulforodamina u ovoalbúmina o E2V3 o ADN que expresaba gp160. Los tres últimos fueron los antígenos estudiados, mientras que el primero se utilizó como colorante para evaluar la penetración en la superficie de la cavidad bucal de los conejos. Luego de insertar las microagujas durante 2 minutos, se observó la eficiencia de entrega de los recubrimientos de microagujas, en el labio, fue cercano a un 63% y para la lengua fue alrededor de un 91%. Estos valores resultaron ser bastante similares a los que se había estudiado previamente para las administraciones en la superficie de la piel, los cuales fueron entre un 50% y un 90% [88, 90, 91]. En cuanto a la eficiencia de entrega, se puede mencionar que es un parámetro que está íntimamente relacionado con la naturaleza de los materiales, específicamente con su hidrofiliidad. En estudios posteriores se ha observado que, para los recubrimientos hidrófilos, la eficiencia de administración es mucho mayor en los modelos de piel humana y de ratón en comparación con los recubrimientos de naturaleza hidrofóbica [81, 91]. Otro parámetro a considerar es el espesor del recubrimiento, el cual se ha relacionado con una menor eficiencia de entrega [91]. A pesar de las condiciones desfavorables que pueden existir en el interior de la cavidad bucal, como la falta de estructura ósea y el flujo de saliva, la administración mediante microagujas confiere una eficacia de administración adecuada. A pesar de las diferencias entre el labio interno y la superficie dorsal de la lengua, las respuestas inmunes contra la ovoalbúmina fueron bastante similares. Ambos sitios fueron igualmente inmunogénicos y adecuados para la administración de antígenos, generando una respuesta inmune después de la administración de una dosis de refuerzo. En este estudio, se demuestra una vez más la capacidad de la vía mucosa para inducir mejores respuestas que la vía intramuscular para la inmunización contra el VIH. La respuesta sistémica generada por la vía IM fue similar a la de la vía mucosa, lo que resultó en niveles similares de IgG. Sin embargo, al comparar

la respuesta inmune en saliva, se observa que los niveles de IgA alcanzados por la vía mucosa fueron más altos que en la vía IM, donde la respuesta inmune fue bastante débil. En otro estudio donde también se utilizó ovoalbúmina como antígeno, se prepararon microagujas recubiertas con OVA y con OVA más Toxina del Cólera (TC) como adyuvante y discos sin puntas. Luego se evaluaron los niveles de IgG después de dos semanas de la segunda administración de estos sistemas de administración [81]. En este caso, la matriz tenía 13 agujas y ambas matrices de microagujas, y los discos se prepararon por microfresado y las réplicas por micromoldeado. Ambas estructuras están fabricadas a base de ácido poliláctico (PLA), y los recubrimientos se fabricaron a base de carboximetilcelulosa (CMC), a la que posteriormente se agregaron OVA y TC si correspondía. En este caso, la base de PLA actúa como una capa de respaldo para soportar el sistema. Se ha demostrado que todas las microagujas se insertaron con éxito en la mucosa y que el recubrimiento pudo disolverse en su interior debido a la alta solubilidad del componente principal. Se estudió la distribución de OVA más un marcador fluorescente en mucosa porcina. Al comparar los resultados de las microagujas y los discos se obtuvo que, a los 20 minutos, las microagujas ya habían difundido hacia la mucosa. Por otro lado, en el caso de los discos, ocurrió muy lentamente, lo que indica que debe estar en contacto con la superficie durante varias horas para entregar su contenido por vía transmucosa. Al realizar la vacunación *in vivo*, los dispositivos se colocaron durante 20 minutos y luego se evaluaron las respuestas inmunes. En el caso de los discos, no se observa una respuesta efectiva a nivel de las mucosas, muy probablemente porque lleva más tiempo liberar el contenido. Por otro lado, para las matrices de microagujas se obtuvo una mayor respuesta en comparación con la inducida por los discos. Además, al comparar la respuesta inducida por la matriz de microagujas que contiene TC como adyuvante, el aumento en los títulos de IgG fue aún mayor.

Con microagujas solubles, es posible incluir lisosomas dentro de la formulación para que sean un bloque de construcción de la estructura de la aguja lo cual ayuda a la liberación en las membranas mucosales y disolviéndose localmente para liberar el antígeno. Recientemente este sistema de administración de antígenos se ha probado para la cavidad bucal. Zhen y col. describen una matriz de microagujas fabricada en base a liposomas de manosa-PEG-colesterol (MPC) / lípido-A en donde se utilizó albúmina de suero bovino BSA (por su nombre en inglés bovine serum albumin) como modelo de antígeno. Estas microagujas se fabricaron mediante un procedimiento de emulsificación-liofilización en el que posteriormente se utilizó un molde inverso para formar la matriz de estructura 6 × 6 de las microagujas [82]. El atributo más importante para disolver las microagujas es que deben

ser lo suficientemente duras para penetrar en el sitio de administración, lo que se logró en este estudio mediante una matriz de sacarosa y polivinilpirrolidona. Una vez más, se compararon las vías de administración convencionales y no convencionales; en este caso, se observa que por vía subcutánea no fue posible inducir una respuesta inmune mucosal, a diferencia de la inmunización mediante microagujas administradas en la cavidad oral donde se presentaron altos niveles de IgA en saliva, lavados intestinales y vaginales. Estos parámetros también se compararon con los liposomas libres, donde se observa una respuesta mucho menor que en comparación con la matriz de microagujas rellenas de liposomas pro-MPC/ lípido-A. El dispositivo aplicador de microagujas puede servir de base ya que, a diferencia de otras zonas de la piel, la mucosa carece de músculos o huesos que puedan brindar soporte. Los sistemas de aplicación se utilizan para mejorar la eficiencia de la entrega y reducir las variaciones que pueden existir en usuarios con poca experiencia en la inserción del dispositivo [92].

La mayoría de las vacunas administradas por vías convencionales requieren cadenas de frío, lo que dificulta la distribución y el transporte. A través de las microagujas, es posible reducir los requisitos de temperatura para mantener la estabilidad. En el caso de las microagujas MPC/liposomas de lípido A, los resultados de los estudios de estabilidad mostraron que permanecieron estables después seis meses a 4°C durante, dos semanas a 25°C o durante tres días a 40°C [82]. Solo se observan ligeras variaciones en tamaño y potencial zeta, mientras que al analizar la integridad del antígeno modelo se ha demostrado que no hubo degradación significativa. Esto indica que estas matrices de microagujas se pueden mantener bajo una cadena de temperatura controlada. Estos no requieren un alto consumo energético, a diferencia de algunas vacunas parenterales que deben almacenarse a muy bajas temperaturas. Esta es una ventaja para la logística de distribución y transporte, que abarata costos y da mayor accesibilidad a la inmunización en regiones donde no es posible mantener cadenas de frío extremas.

Los sistemas de microagujas definitivamente tienen un gran potencial para usarse como medio de inmunización contra patógenos que afectan las vías mucosales. Dadas las amplias ventajas que poseen estos sistemas de administración, son estables a temperatura ambiente [82, 83, 93–95], fáciles de usar, indoloros, cómodos para el paciente [96] y no requieren personal capacitado. Todas estas características las hacen útiles cuando se considera la inmunización masiva en un período corto de tiempo, como se requiere en tiempos de pandemia. En definitiva, la inmunización con microagujas en la cavidad bucal es un campo en el que aún se desconocen muchos detalles ya que la gran mayoría de los

estudios relacionados con la administración de vacunas con microagujas utilizan la piel como lugar de administración y tan solo unos pocos se han centrado en la cavidad oral. Si bien la información sobre este tema específico es limitada, los resultados obtenidos por las investigaciones han sido bastante favorables y alentadores. En la Tabla 2 se ofrece un resumen de los estudios mencionados sobre películas y sistemas de matriz de microagujas. En el futuro, podría ser interesante ampliar el alcance de la administración cutánea a las vías mucosales. Además, de esta manera, incluso puede ser posible obtener una respuesta inmune más robusta.

### 3.3 Adyuvantes mucosales

La tolerancia es un obstáculo que presenta la cavidad bucal como lugar de administración de antígenos, por lo que muchas formulaciones terminan siendo ineficaces a la hora de evaluar la inducción de respuestas inmunes. La coadministración de un agente potenciador de la respuesta inmune como adyuvantes ayuda a potenciar la inmunogenicidad de la formulación. Aunque existen compuestos bastante efectivos, generalmente son peligrosos para su uso en humanos, ya que muchos provienen de toxinas bacterianas y son capaces de causar toxicidades notables. El desarrollo de adyuvantes de la mucosa seguros y eficaces podría ser tan importante como el desarrollo de antígenos, ya que ambos son necesarios para una inmunización eficaz y segura. Los adyuvantes presentados a continuación se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Una recopilación de moléculas informadas utilizadas como adyuvantes de la mucosa.

Adyuvante	Origen	Efecto	Referencia
Toxina del cólera	<i>Vibrio cholerae</i>		[97]
CTA1-DD			[98]
Enterotoxina termolábil LT	<i>Escherichia coli</i>	Inmunoestimulador	[99]
DmLT			[100]
CpG DNA	Oligonucleótido ADN		[101]
Quitosano	Polisacárido catiónico	Mejora la adsorción de antígenos.	[102]
Polietilenglicol (PEG)	Polimérico	Mucoadhesión y mucopenetración	[103]

### 3.3.1 Enterotoxinas bacterianas

En cuanto a los adyuvantes de bacterias patógenas, la toxina del cólera (TC) es la principal enterotoxina producida por la bacteria *Vibrio cholerae*. Esta toxina está compuesta por cinco subunidades de unión (B) y una subunidad A tóxica activa. La TC actúa aumentando la presentación de antígenos por macrófagos, enterocitos y células B, lo que es relevante dentro de los adyuvantes de la mucosa ya que se ha demostrado que tiene una gran potencia [97]. Sin embargo, a pesar de ser eficaz, presenta una toxicidad significativa en el ser humano, generando enterotoxicidad y diarreas graves [98]. También se han informado acumulaciones en el sistema nervioso central asociadas con efectos secundarios neurológicos [62]. Sin embargo, todavía se usa ampliamente en modelos animales para evaluar las respuestas inmunes de las formulaciones. En la administración de antígenos donde se utilizó TC como adyuvante, se observó que no hubo efectos adversos ni a través de películas bucales ni por inyecciones subcutáneas en conejos [15]. Para separar la actividad adyuvante y la enterotoxicidad, se utilizan subunidades de TC no tóxicas. Un ejemplo de lo anterior es el adyuvante CTA1-DD que es completamente no tóxico y seguro. Dosis de 200 µg administradas en ratones y monos no presentaron efectos tóxicos aparentes, mientras que la misma dosis de TC resultaría letal [104]. En cuanto a la administración a través de la cavidad oral, se ha evaluado la efectividad de la inmunización en un sistema de microagujas orales, en el que se evaluó la inmunogenicidad de la formulación OVA con y sin adyuvante. Se observa que el sistema de administración es capaz de generar una respuesta inmune leve sin adyuvante; sin embargo, en comparación con la generada por la formulación que contiene TC, esta inducción del sistema inmunológico fue mucho mayor. También se observa que esta formulación de microagujas con OVA más TC es capaz de generar respuestas inmunes tanto sistémicas como locales [81]. Además de la toxina del cólera, también existe la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT), que tiene propiedades inmunomoduladoras similares a las de la TC y un potencial similar como adyuvante [99]. Pero al igual que la TC, causa diarrea severa, por lo que la forma nativa no es adecuada para su uso como adyuvante de la mucosa en humanos. Se han desarrollado varias mutaciones de LT para reducir los efectos tóxicos; sin embargo, algunos de ellos, además de perder la toxicidad, también perdieron el efecto adyuvante. Sin embargo, no todas las mutaciones de LT están libres de efectos adversos; el LT de mutante único (LTR192G) se utilizó en un estudio clínico [105] que implicó la vacunación contra *Helicobacter pylori* por vía oral. Resultó que algunos voluntarios tuvieron

episodios de diarrea que, en algunos casos, duraron hasta tres días. Este efecto secundario se observó solo en sujetos a los que se les administró mLTL, ya sea en asociación o no con la vacuna en estudio. Mientras que todos los voluntarios presentaron al menos un efecto gastrointestinal, que se puede atribuir tanto a la vacuna como al adyuvante. Sin embargo, esta complicación no es la primera vez que ocurre en un ensayo clínico. Se usó LTL nativa como adyuvante nuevamente para una vacuna contra *H. pylori*. En donde la incidencia de diarrea en los voluntarios fue bastante alta, y en algunos de ellos esta complicación fue tal que afectó sus actividades diarias. En consecuencia, la cantidad de LTL administrada tuvo que reducirse a la mitad [106]. El desarrollo de variaciones de LTL como la toxina termolábil doble mutante (dmLTL) ha demostrado una fuerte respuesta inmunitaria de la mucosa en ratones [95], donde se evaluó la respuesta inmunitaria contra *H. pylori* después de la inmunización sublingual. Resultó que la dmLTL y la TC presentaron potencias similares como adyuvante, actuando principalmente en los ganglios linfáticos cervicales después de la administración sublingual. Sin embargo, al comparar la respuesta observada en el ganglio linfático mesentérico a la misma dosis, pero en administración intragástrica, fue mucho menor. En cuanto a dmLTL, ya existen estudios clínicos de fase 1 donde este adyuvante se ha utilizado en vacunaciones orales. Se probó la seguridad y tolerabilidad de la vacuna utilizada sin el adyuvante, con 10 µg o 20 µg de dmLTL. Los resultados mostraron que la vacuna en estas tres formas resultó ser segura y bien tolerada por los voluntarios [107]. Solo tres voluntarios de un total de 129 tenían diarrea, uno de ellos no se atribuyó a la vacuna ya que solo habían recibido un placebo. En el último estudio, informó que la adición de dmLTL a la formulación de la vacuna no alteró el perfil de seguridad.

### **3.3.2 Agonista del receptor tipo Toll**

Otro adyuvante es el oligodesoxinucleótido CpG, que consiste en una pequeña cadena de ADN sintético que ha demostrado tener una gran actividad inmunoestimuladora cuando se administra por vía parenteral pero también por vía mucosa [108, 109]. La acción del CpG sintético es imitar una estimulación por una infección bacteriana y luego interactuar con el Receptor 9 tipo Toll (TLR-9) [101]. Esto se puede ver en ratones knockout para TLR9, en los que no es posible observar ninguna respuesta inmune después de la administración de CpG. En un estudio realizado en el que se realizó la vacunación sublingual contra *Porphyromonas gingivalis* utilizando CpG como adyuvante [110]. Se determinó que el uso de CpG en la formulación resultó en respuestas inmunes más potentes. Cuando se añadió

CpG a la formulación, se observó una alta concentración de IgG e IgA en bazo y saliva, respectivamente. Mientras que cuando no se administró adyuvante, los niveles de anticuerpos y células formadoras de anticuerpos permanecieron indetectables. En cuanto a la potencia de CpG, se ha visto que se genera sinergia con TC cuando se aplica simultáneamente, su actividad aumenta significativamente, logrando mayores respuestas que aquellas en comparación con diez veces cada adyuvante por separado [109].

### 3.3.3 Polímeros

El quitosano es un polisacárido catiónico que tiene una gran compatibilidad biológica y además es biodegradable. Tiene muchos usos; entre ellos, es capaz de mejorar el transporte paracelular a través del epitelio, lo que resulta de gran utilidad a la hora de plantearse potenciar la absorción de antígenos administrados por vía mucosa. Hay investigadores que están de acuerdo con esta información ya que se demostró un aumento en el transporte y la penetración de moléculas en presencia de quitosano a través de vías que involucran a la mucosa [111–113]. Se piensa que el mecanismo de acción que a través de la protección del antígeno logra una mayor captación y presentación, lo que conduce a una mayor respuesta inmune [114–116]. El quitosano también se ha utilizado para la fabricación de microagujas, donde tendría diversos usos; estructural, como adyuvante mucosal y para conseguir una liberación prolongada. Otro uso que se le ha dado al quitosano es la fabricación de vehículos nano y micrométricos para la administración de vacunas [102]. El quitosano también se ha utilizado para la fabricación de películas mucoadhesivas multicapa en las que las formulaciones compuestas por quitosano pudieron liberar casi todas las partículas adsorbidas *in vitro* [77].

Entre las barreras más importantes que existen en la cavidad bucal y en muchas otras se encuentra la barrera mucosa, que cumple la función de proteger al organismo de amenazas exógenas. Por esta razón, a menudo es difícil lograr una inmunización eficaz en estas áreas. Para superar este obstáculo, se han utilizado partículas con características mucopenetrantes que ayudan a difundirse rápidamente a través de la mucosidad. Para lograr producir partículas con estas características, un recubrimiento de polietilenglicol (PEG) puede conferir la capacidad de atravesar la barrera mucosal. Sin embargo, para lograrlo con éxito, el revestimiento debe ser lo suficientemente denso; de lo contrario, las partículas pueden quedar atrapadas en el moco, lo que enlentece su penetración [86]. El PEG tiene una doble acción, donde puede proporcionar propiedades mucoadhesivas o mucopenetrantes dependiendo principalmente de la densidad del recubrimiento y del peso

molecular. Cuando el recubrimiento es denso con PEG de bajo peso molecular, conduce a una rápida penetración del moco. En el caso contrario, cuando se usa PEG de alto peso molecular, la mucoadhesión aumenta debido a las interacciones intermoleculares como los enlaces de hidrógeno con las mucinas. El PEG se ha utilizado ampliamente en el desarrollo farmacéutico centrado en la administración de proteínas y nanopartículas, ya que aumenta su vida media al reducir las interacciones con las proteínas séricas y macrófagos [103, 117]. En relación con la administración de antígenos, el PEG se ha utilizado para recubrir nanopartículas que se encuentran dentro de una película para ser utilizadas como inmunización oral y sublingual [77]. En este caso, se diseñó una película en la que una de las capas presentaba características mucoadhesivas utilizando hidroxipropilmetilcelulosa y carbopol, mientras que la capa de reservorio contenía nanopartículas mucopenetrantes. Ambas estrategias funcionan en conjunto para lograr una mejor entrega. Además de presentar características mucopenetrantes, la inclusión de PEG en la formulación podría ayudar a mejorar la liberación de nanopartículas en los ganglios linfáticos, lo cual es bastante interesante cuando se formula una vacuna mucosal [103]. El grado de PEGilación puede influir en el direccionamiento de varias células, como las células dendríticas que migran y puede conducir a una respuesta inmune más robusta. Se sabe que la PEGilación influye en el drenaje del transporte de los ganglios linfáticos y la acumulación de antígenos [118]; sin embargo, no se ha demostrado un mecanismo completamente correcto. Aunque se ha demostrado que al administrar partículas PEGiladas se ha incrementado la presentación de antígenos y cebado de células T, además de presentar una focalización hacia los ganglios linfáticos [119]. Sin embargo, el mecanismo del PEG no está del todo claro ya que son muchos los factores que influyen en el tráfico linfático de partículas y los resultados de los estudios no han sido del todo precisos. Sin duda, el PEG tiene muchos usos en la industria farmacéutica además de un gran potencial en la administración de antígenos por vía mucosal por todas las propiedades que puede conferir a las partículas en el campo de la inmunización.

## Conclusiones

La inmunización por vías no convencionales como la vía oral y sublingual ha mostrado un gran potencial acompañada de una destacada eficacia por otras vías parenterales. Es sumamente importante desarrollar formulaciones de vacunas que se administren por vía mucosal ya que serían de gran utilidad en la actualidad. Sin duda, nos enfrentamos a un mundo diferente, donde los patógenos que acceden al organismo por vías mucosales presentan un gran riesgo para la población mundial. El fortalecimiento del sistema inmunológico de las mucosas sugiere una protección adicional contra estas amenazas. Más allá de lo efectivas que podrían ser las vacunas mucosales, también destacan muchas otras ventajas relacionadas con el transporte y fabricación de dosis. Actualmente, lograr un programa de inmunización masivo y eficaz contra el SARS-CoV2 (del inglés *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) ha sido uno de los mayores desafíos de los tiempos modernos. El almacenamiento y transporte de las dosis requieren cadenas de suministro en donde se mantengan temperaturas considerablemente bajas las cuales pueden llegar a ser difíciles de mantener, por lo que aumentan los costos asociados con la vacunación. Por lo tanto, se obstaculiza el acceso a vacunas para muchos países de bajos ingresos con una logística de cadena de frío limitada, lo que lleva a inmunizaciones sub-óptimas. Se ha demostrado que el desarrollo de vacunas en formas de dosificación oral, como películas [7, 78] y matrices de microagujas [82], pueden ser capaces de mantener su estabilidad incluso en condiciones extremas. Estos sistemas podrían cargarse con partículas de antígeno que se encuentran en forma de polvo seco, por tanto, al estar en estado sólido, no requerirían de almacenamiento en congelador o frigorífico [120], lo que facilitaría tanto el almacenamiento como el transporte de las dosis. El método de autoinmunización sin punción permite inmunizaciones masivas y mejora el cumplimiento del paciente en comparación con las administraciones convencionales. Todos estos factores son beneficiosos en el contexto de la vacunación masiva; estos sistemas de administración proponen múltiples beneficios para el paciente. Tales como facilidad de administración a todas las edades, comodidad, aplicación indolora y sin riesgo de asfixia; por lo tanto, incluso se podrían autoadministrar. Además, el hecho de que no tengan agujas conlleva un menor riesgo de contaminación por residuos biológicos. La autoinmunización también puede ser beneficiosa en tiempos de pandemia cuando se requiere inmunización masiva; puede ayudar a reducir la carga sobre el sistema de salud, especialmente para los trabajadores de primera línea. Debido a que han mostrado un gran potencial, estas tecnologías podrían

revolucionar la forma de vacunación de la población, conduciendo a un proceso de inmunización más económico y cómodo.

## Referencias

1. González C (2020) Programa nacional de inmunización en Chile, pasado, presente y futuro. *Rev Médica Clínica Las Condes* 31:225–232.  
<https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2020.04.005>
2. Johansen P, Kündig TM (2015) Parenteral Vaccine Administration: Tried and True. In: Foged C, Rades T, Perrie Y, Hook S (eds) *Subunit Vaccine Delivery*. Springer New York, New York, NY, pp 261–286
3. Nyström J, Raghavan S, Svennerholm A-M (2006) Mucosal immune responses are related to reduction of bacterial colonization in the stomach after therapeutic *Helicobacter pylori* immunization in mice. *Microbes Infect* 8:442–449.  
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.07.010>
4. Gallichan WS, Rosenthal KL (1996) Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *J Exp Med* 184:1879–1890.  
<https://doi.org/10.1084/jem.184.5.1879>
5. Hervouet C, Luci C, Çuburu N, et al (2010) Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract. *Vaccine* 28:5582–5590. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.033>
6. Riese P, Sakthivel P, Trittel S, Guzmán CA (2014) Intranasal formulations: promising strategy to deliver vaccines. *Expert Opin Drug Deliv* 11:1619–1634.  
<https://doi.org/10.1517/17425247.2014.931936>
7. Bajrovic I, Schafer SC, Romanovicz DK, Croyle MA (2020) Novel technology for storage and distribution of live vaccines and other biological medicines at ambient temperature. *Sci Adv* 6:eaau4819. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau4819>
8. Uddin MN, Allon A, Roni MA, Kouzi S (2019) Overview and Future Potential of Fast Dissolving Buccal Films as Drug Delivery System for Vaccines. *J Pharm Pharm Sci* 22:388–406. <https://doi.org/10.18433/jpps30528>
9. Trincado V, Gala RP, Morales JO (2021) Buccal and Sublingual Vaccines: A Review on Oral Mucosal Immunization and Delivery Systems. *Vaccines* 9:1177.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines9101177>
10. Web of Science. <https://www-webofscience-com.uchile.idm.oclc.org/wos/woscc/basic-search>
11. Davitt CJH, Lavelle EC (2015) Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. *Adv Drug Deliv Rev* 91:52–69.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.007>

12. Vela Ramirez JE, Sharpe LA, Peppas NA (2017) Current state and challenges in developing oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 114:116–131.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.04.008>

13. Zhang T, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yamamoto M (2009) Sublingual vaccination with outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and Flt3 ligand elicits protective immunity in the oral cavity. *Biochem Biophys Res Commun* 390:937–941.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.081>

14. Kiyono H, Azegami T (2015) The mucosal immune system: From dentistry to vaccine development. *Proc Jpn Acad Ser B* 91:423–439.

<https://doi.org/10.2183/pjab.91.423>

15. Cui Z, Mumper RJ Bilayer Films for Mucosal (Genetic) Immunization via the Buccal Route in Rabbits. 7

16. Ashkenazi S, Vertruyen A, Arstegui J, et al (2006) Superior Relative Efficacy of Live Attenuated Influenza Vaccine Compared With Inactivated Influenza Vaccine in Young Children With Recurrent Respiratory Tract Infections: *Pediatr Infect Dis J* 25:870–879.

<https://doi.org/10.1097/01.inf.0000237829.66310.85>

17. Lundholm P (1999) Induction of mucosal IgA by a novel jet delivery technique for HIV-1 DNA. *Vaccine* 17:2036–2042. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00404-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00404-6)

18. Gala RP, Popescu C, Knipp GT, et al (2017) Physicochemical and Preclinical Evaluation of a Novel Buccal Measles Vaccine. *AAPS PharmSciTech* 18:283–292.

<https://doi.org/10.1208/s12249-016-0566-3>

19. Negri DRM, Riccomi A, Pinto D, et al (2010) Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. 6

20. Rappuoli R, Pizza M, Douce G, Dougan G (1999) Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immunol Today* 20:493–500. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(99\)01523-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01523-6)

21. McGhee JR, Fujihashi K (2012) Inside the Mucosal Immune System. *PLoS Biol* 10:e1001397. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001397>

22. Croitoru K, Bienenstock J (1994) Characteristics and Functions of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. In: *Handbook of Mucosal Immunology*. Elsevier, pp 141–149

23. Holmgren J, Czerkinsky C (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11:S45–S53. <https://doi.org/10.1038/nm1213>

24. Brandtzaeg P (2010) Function of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue in Antibody

- Formation. *Immunol Invest* 39:303–355. <https://doi.org/10.3109/08820131003680369>
25. Gamazo C, Martín-Arbella N, Brotons A, et al (2015) Mimicking microbial strategies for the design of mucus-permeating nanoparticles for oral immunization. *Eur J Pharm Biopharm* 96:454–463. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.01.010>
  26. Gao T, Cen Q, Lei H (2020) A review on development of MUC1-based cancer vaccine. *Biomed Pharmacother* 132:110888. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110888>
  27. Pinzón Martín S, Seeberger PH, Varón Silva D (2019) Mucins and Pathogenic Mucin-Like Molecules Are Immunomodulators During Infection and Targets for Diagnostics and Vaccines. *Front Chem* 7:710. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00710>
  28. Cesta MF (2006) Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol Pathol* 34:599–608. <https://doi.org/10.1080/01926230600865531>
  29. Ruehl-Fehlert C, Parker GA, Elmore SA, Kuper CF (2018) Immune System. In: *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. Elsevier, pp 273–313
  30. Rand JH, Wu X-X, Lin EY, et al (2012) Annexin A5 Binds to Lipopolysaccharide and Reduces Its Endotoxin Activity. *mBio* 3:. <https://doi.org/10.1128/mBio.00292-11>
  31. Ohno H, Hase K (2010) Glycoprotein 2 (GP2): grabbing the FimH<sup>+</sup> bacteria into M cells for mucosal immunity. *Gut Microbes* 1:407–410. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.6.14078>
  32. Wang J, Gusti V, Saraswati A, Lo DD (2011) Convergent and Divergent Development among M Cell Lineages in Mouse Mucosal Epithelium. *J Immunol* 187:5277–5285. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102077>
  33. Wang M, Gao Z, Zhang Z, et al (2014) Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccines Immunother* 10:3544–3551. <https://doi.org/10.4161/hv.36174>
  34. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, et al (2013) Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 6:666–677. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.30>
  35. Bankvall M, Östberg A-K, Jontell M, et al (2016) The engagement of oral-associated lymphoid tissues during oral versus gastric antigen administration. *Immunology* 149:98–110. <https://doi.org/10.1111/imm.12633>
  36. Yuki Y, Kiyono H (2003) New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev Med Virol* 13:293–310. <https://doi.org/10.1002/rmv.398>
  37. Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, et al (1999) Nasal Immunization Induces *Haemophilus influenzae*-specific Th1 and Th2 Responses with Mucosal IgA and

Systemic IgG Antibodies for Protective Immunity. *J Infect Dis* 180:122–132.

<https://doi.org/10.1086/314827>

38. Wu H-Y, Russell MW (1997) Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 16:187.

<https://doi.org/10.1007/BF02786362>

39. Hiroi T, Iwatani K, Iijima H, et al Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur J Immunol* 8

40. Kiyono H, Fukuyama S (2004) NALT- versus PEYER'S-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 4:699–710. <https://doi.org/10.1038/nri1439>

41. Lycke N (2012) Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol* 12:592–605. <https://doi.org/10.1038/nri3251>

42. Li M, Wang Y, Sun Y, et al (2020) Mucosal vaccines: Strategies and challenges. *Immunol Lett* 217:116–125. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.10.013>

43. Belyakov IM, Derby MA, Ahlers JD, et al (1998) Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. *Proc Natl Acad Sci* 95:1709–1714. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1709>

44. Roan NR, Gierahn TM, Higgins DE, Starnbach MN (2006) Monitoring the T cell response to genital tract infection. *Proc Natl Acad Sci* 103:12069–12074.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0603866103>

45. Bolton DL, Song K, Wilson RL, et al (2012) Comparison of systemic and mucosal vaccination: impact on intravenous and rectal SIV challenge. *Mucosal Immunol* 5:41–52.

<https://doi.org/10.1038/mi.2011.45>

46. Pinczewski J, Zhao J, Malkevitch N, et al (2005) Enhanced Immunity and Protective Efficacy against SIV<sub>mac251</sub> Intrarectal Challenge Following Ad-SIV Priming by Multiple Mucosal Routes and gp120 Boosting in MPL-SE. *Viral Immunol* 18:236–243.

<https://doi.org/10.1089/vim.2005.18.236>

47. Song K, Bolton DL, Wei C-J, et al (2010) Genetic immunization in the lung induces potent local and systemic immune responses. *Proc Natl Acad Sci* 107:22213–22218.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1015536108>

48. Balmelli C, Demotz S, Acha-Orbea H, et al (2002) Trachea, Lung, and Tracheobronchial Lymph Nodes Are the Major Sites Where Antigen-Presenting Cells Are Detected after Nasal Vaccination of Mice with Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like

- Particles. *J Virol* 76:12596–12602. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.12596-12602.2002>
49. Nardellihaefliger D, Lurati F, Wirthner D, et al (2005) Immune responses induced by lower airway mucosal immunisation with a human papillomavirus type 16 virus-like particle vaccine. *Vaccine* 23:3634–3641. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.02.019>
50. Woof JM, Mestecky J (2005) Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 206:64–82. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00290.x>
51. Petäjä T, Pedersen C, Poder A, et al (2011) Long-term persistence of systemic and mucosal immune response to HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine in preteen/adolescent girls and young women. *Int J Cancer* 129:2147–2157. <https://doi.org/10.1002/ijc.25887>
52. Wang J, Murakami T, Hakamata Y, et al (2001) Gene gun–mediated oral mucosal transfer of interleukin 12 cDNA coupled with an irradiated melanoma vaccine in a hamster model: Successful treatment of oral melanoma and distant skin lesion. *Cancer Gene Ther* 8:705–712. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700363>
53. Effros RB, Bennink J, Doherty PC (1978) Characteristics of secondary cytotoxic T-cell responses in mice infected with influenza A viruses. *Cell Immunol* 36:345–353. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(78\)90278-2](https://doi.org/10.1016/0008-8749(78)90278-2)
54. Hill AB, Blanden RV, Parrish CR, Müllbacher A (1992) Restimulated memory Tc cells have a higher apparent avidity of interaction with targets than primary virusimmune Tc cells as indicated by anti-CD 8 blocking. *Immunol Cell Biol* 70:259–265. <https://doi.org/10.1038/icb.1992.33>
55. Nugent CT, Wolcott RM, Chervenak R, Jennings SR (1994) Analysis of the cytolytic T-lymphocyte response to herpes simplex virus type 1 glycoprotein B during primary and secondary infection. *J Virol* 68:7644–7648. <https://doi.org/10.1128/JVI.68.11.7644-7648.1994>
56. Müllbacher A (1994) The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *J Exp Med* 179:317–321. <https://doi.org/10.1084/jem.179.1.317>
57. Mackay CR (1993) Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5:423–427. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90063-X](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90063-X)
58. Mestecky J (1987) The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 7:265–276. <https://doi.org/10.1007/BF00915547>
59. McDermott MR, Goldsmith CH, Rosenthal KL, Brais LJ T Lymphocytes in Genital Lymph Nodes Protect Mice from Intmvaginal Infection with Herpes Simplex Virus Type 2. 7

60. Picker LJ (1994) Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 6:394–406. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(94\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90118-X)
61. Seavey MM, Mosmann TR (2009) Estradiol-induced vaginal mucus inhibits antigen penetration and CD8+ T cell priming in response to intravaginal immunization. *Vaccine* 27:2342–2349. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.025>
62. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al (2004) Use of the Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and the Risk of Bell's Palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350:896–903. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030595>
63. Czerkinsky C, Çuburu N, Kweon M-N, et al (2011) Sublingual vaccination. *Hum Vaccin* 7:110–114. <https://doi.org/10.4161/hv.7.1.13739>
64. Çuburu N, Kweon M-N, Song J-H, et al (2007) Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 25:8598–8610. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.09.073>
65. Kweon M-N (2011) Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity. *Cytokine* 54:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.12.014>
66. Damjanovic D, Zhang X, Mu J, et al (2008) Organ distribution of transgene expression following intranasal mucosal delivery of recombinant replication-defective adenovirus gene transfer vector. *Genet Vaccines Ther* 6:5. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-6-5>
67. Lewis DJM, Huo Z, Barnett S, et al (2009) Transient Facial Nerve Paralysis (Bell's Palsy) following Intranasal Delivery of a Genetically Detoxified Mutant of Escherichia coli Heat Labile Toxin. *PLoS ONE* 4:e6999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006999>
68. Song J-H, Nguyen HH, Cuburu N, et al (2008) Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci* 105:1644–1649. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708684105>
69. Sato S, Kiyono H (2012) The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr Opin Virol* 2:225–232. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.009>
70. Incorvaia C (2010) Development of a sublingual allergy vaccine for grass pollinosis. *Drug Des Devel Ther* 99. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S10044>
71. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, et al (2007) Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 62:976–990. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01393.x>
72. Bousquet J, Lockey R, Malling H (1998) Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases A WHO position paper☆☆★☆☆◇. *J Allergy Clin Immunol* 102:558–562. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70271-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70271-4)

73. Passalacqua G, Lombardi C, Canonica GW (2004) Sublingual immunotherapy: an update: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4:31–36. <https://doi.org/10.1097/00130832-200402000-00007>
74. Durham SR (2008) Sublingual immunotherapy: what have we learnt from the 'big trials'? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8:577–584. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e3283196764>
75. Holt PG, Vines J, Britten D (1988) Sublingual allergen administration. I. Selective suppression of IgE production in rats by high allergen doses. *Clin Immunol Immunopathol* 49:229–234. <https://doi.org/10.1016/j.clim.1988.02.004>
76. Lou H, Liu M, Qu W, et al (2014) Evaluation of Chlorpheniramine Maleate microparticles in orally disintegrating film and orally disintegrating tablet for pediatrics. *Drug Dev Ind Pharm* 40:910–918. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.789907>
77. Mašek J, Lubasová D, Lukáč R, et al (2017) Multi-layered nanofibrous mucoadhesive films for buccal and sublingual administration of drug-delivery and vaccination nanoparticles - important step towards effective mucosal vaccines. *J Controlled Release* 249:183–195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.036>
78. Tian Y, Bhide YC, Woerdenbag HJ, et al (2020) Development of an Orodispersible Film Containing Stabilized Influenza Vaccine. *Pharmaceutics* 12:245. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030245>
79. Lal M, White J, Zhu C (2017) Preparing an Adjuvanted Thermo-responsive Gel Formulation for Sublingual Vaccination. In: Fox CB (ed) *Vaccine Adjuvants*. Springer New York, New York, NY, pp 153–163
80. Ma Y, Tao W, Krebs SJ, et al (2014) Vaccine Delivery to the Oral Cavity Using Coated Microneedles Induces Systemic and Mucosal Immunity. *Pharm Res* 31:2393–2403. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1335-1>
81. Oh Y-J, Cha H-R, Hwang SJ, et al (2021) Ovalbumin and cholera toxin delivery to buccal mucus for immunization using microneedles and comparison of immunological response to transmucosal delivery. *Drug Deliv Transl Res*. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00964-z>
82. Zhen Y, Wang N, Gao Z, et al (2015) Multifunctional liposomes constituting microneedles induced robust systemic and mucosal immunoresponses against the loaded antigens via oral mucosal vaccination. *Vaccine* 33:4330–4340. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.081>
83. Wang T, Zhen Y, Ma X, et al (2015) Mannosylated and lipid A-incorporating

cationic liposomes constituting microneedle arrays as an effective oral mucosal HBV vaccine applicable in the controlled temperature chain. *Colloids Surf B Biointerfaces* 126:520–530. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.005>

84. Munang'andu HM (2018) MucoJet: a novel noninvasive buccal mucosa immunization strategy. *Ann Transl Med* 6:64–64. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.01.11>

85. Squier CA, Cox PS, Wertz PW, Downing DT (1986) The lipid composition of porcine epidermis and oral epithelium. *Arch Oral Biol* 31:741–747. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(86\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0003-9969(86)90006-3)

86. Xu Q, Ensign LM, Boylan NJ, et al (2015) Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus *ex Vivo* and Distribution *in Vivo*. *ACS Nano* 9:9217–9227. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03876>

87. Bal SM, Kruithof AC, Zwier R, et al (2010) Influence of microneedle shape on the transport of a fluorescent dye into human skin *in vivo*. *J Controlled Release* 147:218–224. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.104>

88. Gill HS, Prausnitz MR (2007) Coated microneedles for transdermal delivery. *J Controlled Release* 117:227–237. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.10.017>

89. Gill HS, Prausnitz MR (2007) Coating Formulations for Microneedles. *Pharm Res* 24:1369–1380. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9286-4>

90. Kim Y-C, Quan F-S, Compans RW, et al (2010) Formulation and coating of microneedles with inactivated influenza virus to improve vaccine stability and immunogenicity. *J Controlled Release* 142:187–195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.013>

91. Zhao X, Coulman SA, Hanna SJ, et al (2017) Formulation of hydrophobic peptides for skin delivery via coated microneedles. *J Controlled Release* 265:2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.015>

92. van der Maaden K, Sekerdag E, Jiskoot W, Bouwstra J (2014) Impact-Insertion Applicator Improves Reliability of Skin Penetration by Solid Microneedle Arrays. *AAPS J* 16:681–684. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9606-7>

93. Ellison TJ, Talbott GC, Henderson DR (2020) VaxiPatch™, a novel vaccination system comprised of subunit antigens, adjuvants and microneedle skin delivery: An application to influenza B/Colorado/06/2017. *Vaccine* 38:6839–6848. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.07.040>

94. Ali AA, McCrudden CM, McCaffrey J, et al (2017) DNA vaccination for cervical cancer; a novel technology platform of RALA mediated gene delivery via polymeric

microneedles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 13:921–932.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.11.019>

95. Flynn O, Dillane K, Lanza JS, et al (2021) Low Adenovirus Vaccine Doses Administered to Skin Using Microneedle Patches Induce Better Functional Antibody Immunogenicity as Compared to Systemic Injection. *Vaccines* 9:299.

<https://doi.org/10.3390/vaccines9030299>

96. Gill HS, Denson DD, Burriss BA, Prausnitz MR (2008) Effect of Microneedle Design on Pain in Human Volunteers. *Clin J Pain* 24:585–594.

<https://doi.org/10.1097/AJP.0b013e31816778f9>

97. Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C (1993) Cholera toxin and cholera B subunit as oral—mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 11:1179–1184.

[https://doi.org/10.1016/0264-410X\(93\)90039-Z](https://doi.org/10.1016/0264-410X(93)90039-Z)

98. Lycke N (2005) From toxin to adjuvant: basic mechanisms for the control of mucosal IgA immunity and tolerance. *Immunol Lett* 97:193–198.

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.12.008>

99. Clements JD, Hartzog NM, Lyon FL (1988) Adjuvant activity of Escherichia coli heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 6:269–277. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(88\)90223-X](https://doi.org/10.1016/0264-410X(88)90223-X)

100. Sjo L, Yrlid L, Wenzel AU, Raghavan S (2016) Induction of mucosal immune responses against Helicobacter pylori infection after sublingual and intragastric route of immunization. 13

101. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740–745. <https://doi.org/10.1038/35047123>

102. Ahmed T, Aljaeid B (2016) Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Devel Ther* 483. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S99651>

103. Wang Y-Y, Lai SK, Suk JS, et al (2008) Addressing the PEG Mucoadhesivity Paradox to Engineer Nanoparticles that “Slip” through the Human Mucus Barrier. *Angew Chem Int Ed* 47:9726–9729. <https://doi.org/10.1002/anie.200803526>

104. SPANGLERt BD (1992) Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxint. *MICROBIOL REV* 56:26

105. Kotloff KL, Sztein MB, Wasserman SS, et al (2001) Safety and Immunogenicity of Oral Inactivated Whole-Cell Helicobacter pylori Vaccine with Adjuvant among Volunteers with or without Subclinical Infection. *INFECT IMMUN* 69:10

106. Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, et al (1999) Oral immunization with urease and Escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in Helicobacter pylori-infected adults. *Gastroenterology* 116:804–812. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70063-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70063-6)
107. Lundgren A, Bourgeois L, Carlin N, et al (2014) Safety and immunogenicity of an improved oral inactivated multivalent enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) vaccine administered alone and together with dmLT adjuvant in a double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I study. *Vaccine* 32:7077–7084. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.10.069>
108. McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL (2001) The potential of oligodeoxynucleotides as mucosal and parenteral adjuvants. *Vaccine* 19:2657–2660. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00496-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00496-5)
109. McCluskie MJ, Davis HL Cutting Edge: CpG DNA Is a Potent Enhancer of Systemic and Mucosal Immune Responses Against Hepatitis B Surface Antigen with Intranasal Administration to Mice. 5
110. Chang E, Kobayashi R, Hagiwara M, et al (2019) Evaluation of suitable antigens and adjuvant concentration for sublingual immunization to prevent periodontal disease. *Oral Sci Int* 16:80–86. <https://doi.org/10.1002/osi2.1018>
111. Borchard G, Lueßen HL, de Boer AG, et al (1996) The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro. *J Controlled Release* 39:131–138. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00146-8](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00146-8)
112. van der Lubben I (2001) Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials* 22:687–694. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00231-3)
113. Van Der Lubben IM, Konings FAJ, Borchard G, et al (2001) *In Vivo* Uptake of Chitosan Microparticles by Murine Peyer's Patches: Visualization Studies using Confocal Laser Scanning Microscopy and Immunohistochemistry. *J Drug Target* 9:39–47. <https://doi.org/10.3109/10611860108995631>
114. Carroll ElizabethC, Jin L, Mori A, et al (2016) The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. *Immunity* 44:597–608. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.004>
115. Fong D, Grégoire-Gélinas P, Cheng AP, et al (2017) Lysosomal rupture induced by structurally distinct chitosans either promotes a type 1 IFN response or activates the

inflammasome in macrophages. *Biomaterials* 129:127–138.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.022>

116. Chua BY, Sekiya T, Al Kobaisi M, et al (2015) A single dose biodegradable vaccine depot that induces persistently high levels of antibody over a year. *Biomaterials* 53:50–57.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.066>

117. Harris JM, Chess RB (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2:214–221. <https://doi.org/10.1038/nrd1033>

118. Zhan X, Tran KK, Shen H (2012) Effect of the Poly(ethylene glycol) (PEG) Density on the Access and Uptake of Particles by Antigen-Presenting Cells (APCs) after Subcutaneous Administration. *Mol Pharm* 9:3442–3451.

<https://doi.org/10.1021/mp300190g>

119. De Koker S, Cui J, Vanparijs N, et al (2016) Engineering Polymer Hydrogel Nanoparticles for Lymph Node-Targeted Delivery. *Angew Chem Int Ed* 55:1334–1339.

<https://doi.org/10.1002/anie.201508626>

120. Ubale RV, D'souza MJ, Infield DT, et al (2013) Formulation of meningococcal capsular polysaccharide vaccine-loaded microparticles with robust innate immune recognition. *J Microencapsul* 30:28–41. <https://doi.org/10.3109/02652048.2012.692402>