

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 866**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 39/35** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2009 PCT/EP2009/056158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2009 WO09141388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2009 E 09749878 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2303234**

54 Título: **Formulación particulada mucoadhesiva para inducir una tolerancia inmunitaria específica de antígeno**

30 Prioridad:

**20.05.2008 EP 08305182**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.01.2018**

73 Titular/es:

**STALLERGENES (100.0%)  
6, rue Alexis de Tocqueville  
92160 Antony , FR**

72 Inventor/es:

**SAINT-LU, NATHALIE;  
RAZAFINDRATSITA, ALAIN;  
TOURDOT, SOPHIE;  
MOINGEON, PHILIPPE y  
VAN OVERTVELT, LAURENCE**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 648 866 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formulación particulada mucoadhesiva para inducir una tolerancia inmunitaria específica de antígeno

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a una formulación mucoadhesiva para inducir una tolerancia inmunitaria específica de antígeno y a procedimientos que utilizan la misma.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] La inmunoterapia sublingual (SLIT) es un tratamiento no invasivo y eficaz de las alergias respiratorias de tipo I (Canonica & Passalacqua Allergy 2006; 61: 20-23., Wilson et al. Allergy 2005; 60: 4-12). Sin embargo, queda por ser optimizada, con respecto, por ejemplo, a la duración del tratamiento y las pautas de suministro. En este contexto, deben identificarse sistemas de suministro apropiados para mejorar la inducción de tolerancia por la vía sublingual. Las formulaciones mucoadhesivas y/o particuladas parecen ser particularmente prometedoras con el objetivo de (i) aumentar la duración del contacto con la mucosa, mejorando de este modo la cantidad de alérgeno que penetra en la mucosa sublingual, y (ii) dirigir las células presentadoras de antígeno (APC) dentro de la mucosa oral, que son propensas a inducir tolerancia (Moingeon et al Allergy 2006; 61: 151-165, Novak y Bieber J Allergy Clin Immunol 2008; 121: S370-4).

[0003] El quitosano es un polisacárido policatiónico derivado por desacetilación de la quitina. El quitosano se produce de forma natural en crustáceos, insectos, hongos y microorganismos. Es biodegradable, biocompatible, bien tolerado y no muestra propiedades irritantes o sensibilizantes, por consiguiente ha sido aprobado por la FDA para la utilización humana (Jayakumar et al Int J Bio Macromolecules 2007; 40: 175-181).

[0004] Los productos a base de quitosano ya están en uso en las industrias médica, cosméticos, suplementos de la salud y medioambientales. Más particularmente, entre las posibles formas de polímeros a base de quitosano, las partículas de quitosano son interesantes candidatos del sistema de suministro para dirigir el antígeno a las DC de la mucosa debido a su naturaleza policatiónica, que es responsable de su mucoadhesividad, y debido a su forma de partículas, lo cual facilita la captación por las APC y el transporte a los órganos linfoides secundarios (O'Hagan y Valiante Nat Rev Drug Discov 2003; 2: 727-735). En el campo de la inducción de tolerancia específica de antígeno, algunos estudios han investigado el efecto de las partículas de quitosano, sobre todo como un sistema de suministro de genes a través de la ruta intranasal u oral (Roy et al Nat Med 1999; 5: 387-391; Kumar et al Genet Vaccines Ther 2003; 1: 3; Chew et al Vaccine 2003; 21: 2720-2729)). En cuanto al suministro de péptidos usando quitosano, no hay enseñanzas que se puedan derivar de la técnica anterior en relación con el potencial del quitosano como un sistema de suministro. Por lo tanto, Porporatto et al. Int Immunol 2004; 16: 433-441 describen que la administración oral de quitosano de bajo peso molecular en asociación con colágeno de tipo II promueve un medio antiinflamatorio temprano después de la alimentación. Hall et al. J. Allergy Clin Immunol 2002; 100: 883-89 muestran que la administración intranasal de quitosano en asociación con un alérgeno reduce la inflamación de las vías respiratorias. A la inversa, Cunningham et al. Congreso Mundial de Alergia 2007 116, (resumen) indican que la administración sublingual de un alérgeno en asociación con quitosano conduce a una reducción no específica de la inflamación pulmonar, lo que no es superior a la observada cuando el alérgeno se administra solo.

45 **Características de la invención**

[0005] La presente invención surge del descubrimiento inesperado, por los inventores, de que las partículas de quitosano de gran tamaño tenían una mayor capacidad para inducir la tolerancia inmunitaria específica de antígeno en comparación con partículas de quitosano de tamaño inferior.

[0006] Por lo tanto, la presente solicitud describe una composición mucoadhesiva adaptada para prevenir y/o tratar una reacción patológica del sistema inmunitario de un individuo, en particular, mediante la inducción de una tolerancia específica hacia al menos un antígeno implicado en dicha reacción patológica, que comprende partículas de quitosano cargadas con dicho al menos un antígeno implicado en la reacción patológica, en el que el tamaño, o diámetro, de las partículas de quitosano cargadas es de más de 800 nm.

[0007] La presente invención se refiere por tanto a una composición mucoadhesiva adaptada para prevenir y/o tratar una reacción patológica del sistema inmunitario de un individuo mediante la inducción de una tolerancia específica hacia al menos un antígeno implicado en dicha reacción patológica, que comprende partículas de quitosano cargadas con dicho al menos un antígeno implicado en la reacción patológica, siendo dicho antígeno una proteína, un polipéptido o un péptido, en el que el tamaño de las partículas de quitosano cargadas es de 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ , y las partículas de quitosano están formadas de quitosano cuya viscosidad es de al menos 800 mPa.s cuando se mide según el procedimiento de Brookfield con una solución al 1% de quitosano en ácido acético al 1%.

[0008] La presente invención también se refiere a una composición inmunoterapéutica que comprende una composición mucoadhesiva anteriormente definida en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.

**[0009]** La presente solicitud también describe la composición mucoadhesiva como se define anteriormente, o la composición inmunoterapéutica como se define anteriormente, en su aplicación como medicamento, o el uso de la composición mucoadhesiva como se define anteriormente, o la composición inmunoterapéutica como se define anteriormente, para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento está destinado a prevenir y/o tratar una reacción patológica del sistema inmunitario de un individuo, en particular, mediante la inducción de una tolerancia específica hacia al menos un antígeno implicado en dicha reacción patológica.

**[0010]** La presente invención también se refiere a una composición mucoadhesiva, según la presente invención, o una composición inmunoterapéutica, según la presente invención, para utilizar en la prevención y/o tratamiento de una reacción patológica del sistema inmunitario de un individuo mediante la inducción de una tolerancia específica hacia al menos un antígeno implicado en dicha reacción patológica, siendo dicho antígeno una proteína, un polipéptido o un péptido;

en la que la reacción patológica se selecciona de alergia, enfermedad autoinmune o rechazo del injerto; y en la que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en un alérgeno, un autoantígeno y un antígeno específico de injerto.

**[0011]** La presente solicitud describe además la composición mucoadhesiva como se define anteriormente, o la composición inmunoterapéutica como se define anteriormente, para utilizar, en particular como un medicamento, para la prevención y/o tratamiento de una reacción patológica del sistema inmunitario de un individuo, en particular, mediante la inducción de una tolerancia específica hacia al menos un antígeno implicado en dicha reacción patológica.

**[0012]** La presente solicitud también describe un procedimiento para prevenir o tratar una reacción patológica del sistema inmunitario en un individuo, en particular, mediante la inducción de una tolerancia específica hacia al menos un antígeno implicado en dicha reacción patológica, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una composición mucoadhesiva como se define anteriormente.

Descripción detallada de la invención

#### *Antígeno*

**[0013]** Tal como se pretende en el presente documento, un "antígeno implicado en una reacción patológica del sistema inmunitario de un individuo" se refiere a un compuesto que es susceptible de inducir una reacción del sistema inmunitario dirigido específicamente contra el mismo y que es responsable de la aparición o el mantenimiento de una reacción inmunitaria contra el individuo, en particular contra las células, tejidos u órganos del individuo.

**[0014]** El antígeno es una proteína, un polipéptido o un péptido. Tal como se pretende en el presente documento, "proteína" se entenderá que comprende proteína, polipéptido y péptido.

**[0015]** El antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en un alérgeno, un autoantígeno y un antígeno específico de injerto.

**[0016]** En una realización preferida, el antígeno es un alérgeno. Un "alérgeno" se define como una sustancia, normalmente una proteína, que provoca la producción de anticuerpos IgE en individuos predispuestos. Definiciones similares se presentan en las siguientes referencias: Clin. Exp. Allergy, No. 26, pág. 494-516 (1996); Mol. Biol. of Allergy and Immunology, ed. R. Bush, Immunology and Allergy Clinics of North America Series (agosto de 1996).

**[0017]** Preferiblemente, el antígeno es un alérgeno proteico, es decir, cualquier cadena de aminoácidos propensa a desencadenar una respuesta alérgica, incluyendo péptidos cortos de aproximadamente 6 a 20 aminoácidos, polipéptidos, o proteínas completas.

**[0018]** Los ejemplos no limitativos de alérgenos incluyen alérgenos de polen (tales como alérgenos de polen de árboles, hierbas, malezas, y césped), alérgenos de insectos (tales como alérgenos de inhalantes, saliva y veneno, por ejemplo, alérgenos de cucarachas y jejenes, alérgenos de veneno de himenópteros), alérgenos de ácaros, alérgenos de pelo y caspa de animales (por ejemplo perro, gato, caballo, rata, ratón etc.), y alérgenos alimentarios.

**[0019]** Por ejemplo, el alérgeno proteico se puede seleccionar del grupo que consiste en un alérgeno proteico del género *Dermatophagoides*; un alérgeno proteico del género *Felis*; un alérgeno proteico del género *Ambrosia*; un alérgeno proteico del género *Lolium*; un alérgeno proteico del género *Cryptomeria*; un alérgeno proteico del género *Alternaria*; un alérgeno proteico del género *Alder*; un alérgeno proteico del género *Betula*; un alérgeno proteico del género de *Blomia*; un alérgeno proteico del género *Quercus*; un alérgeno proteico del género *Olea*; un alérgeno proteico del género *Artemisia*; un alérgeno proteico del género *Plantago*; un alérgeno proteico del género *Parietaria*; un alérgeno proteico del género *Canine*; un alérgeno proteico del género *Blattella*; un alérgeno proteico del género *Apis*; un alérgeno proteico del género *Cupressus*; un alérgeno proteico del género *Thuja*; un alérgeno

proteico del género *Chamaecyparis*; un alérgeno proteico del género *Periplaneta*; un alérgeno proteico del género *Agropyron*; un alérgeno proteico del género *Secale*; un alérgeno proteico del género *Triticum*; un alérgeno proteico del género *Cynorhodon*; un alérgeno proteico del género *Juniperus*; un alérgeno proteico del género *Dactylis*; un alérgeno proteico del género *Festuca*; un alérgeno proteico del género *Poa*; un alérgeno proteico del género *Avena*; un alérgeno proteico del género *Holcus*; un alérgeno proteico del género *Anthoxanthum*; un alérgeno proteico del género *Arrhenatherum*; un alérgeno proteico del género *Agrostis*; un alérgeno proteico del género *Phleum*; un alérgeno proteico del género *Phalaris*; un alérgeno proteico del género *Paspalum*; y un alérgeno proteico del género *Sorghum*.

10 [0020] Entre los ejemplos de varios alérgenos proteicos conocidos de algunos de los géneros identificados anteriormente se incluyen: *Betula (verrucosa)* Bet v I ; Bet v II; Blomia Blo t I; Blo t III; Blo t V; Blo t XII; *Cynorhodon* Cyn d I; *Dermatophagoides (pteronyssinus o farinae)* Der p I; Der p II; Der p III; Der p VII; Der f I; Der f II; Der f III; Der f VII; 1; *Felis (domesticus)* Fel d I; *Ambrosia (artemiisfolia)* Amb a I.1; Amb a I.2; Amb a I.3; Amb a I.4; Amb a II; *Lolium (perenne)* Lol p I; Lol p II; Lol p III; Lol p IV; Lol p IX (Lol p V o Lol p Ib); *Cryptomeria (japonica)* Cry j I; Cry j II; 15 *Canis (familiaris)* Can f I; Can f II; *Juniperus (sabinoides o virginiana)* Jun s I; Jun v I; *Juniperus (ashei)* Jun a I; Jun a II; *Dactylis (glomerata)* Dac g I; Dac g V; *Poa (pretensis)* Poa p I; Phl p I; Phl p V; Phl p VI y *Sorghum (halepensis)* Sor h I.

20 [0021] Los alérgenos alimentarios pueden provenir de la leche y los productos lácteos, huevos, legumbres (cacahuete y soja), nueces, trigo, crustáceos, peces y moluscos. En particular, los alérgenos alimentarios pueden ser ovoalbúmina o gluten.

25 [0022] Además, similar a la alergia, las enfermedades autoinmunes, tales como diabetes de tipo I, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide son generalmente aceptadas como el resultado de una respuesta mediada por células T específicas de antígeno contra un antígeno que en el caso de la enfermedad autoinmune es un autoantígeno, es decir, un antígeno que pertenece a los propios tejidos del cuerpo. Lo mismo se aplica al fenómeno de rechazo de injerto, en donde el antígeno pertenece al tejido de injerto, posiblemente procedente de otro individuo o incluso de otra especie animal.

30 [0023] En otra realización, el antígeno está implicado en una enfermedad autoinmune o rechazo de injerto.

35 [0024] Se ha encontrado que un número de antígenos (es decir, autoantígenos) causan síntomas en enfermedades autoinmunes (es decir, autoantígenos, tales como la insulina; proteína básica de mielina; factor rh; receptores de acetilcolina; receptores de las células de la tiroides; proteínas de la membrana basal; proteínas de la tiroides; ICA-69 (PM-1); ácido glutámico descarboxilasa (64K o 65K); proteína proteolipídica (PLP), glicoproteína asociada a mielina (MAG), colágeno (tipo II), proteína de choque térmico y carboxipeptidasa H), tales como la diabetes, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple.

40 [0025] Además, el antígeno específico de injerto puede provocar una enfermedad de injerto contra huésped que puede conducir en última instancia al rechazo del injerto.

#### *Partícula de quitosano*

45 [0026] El quitosano es un polisacárido constituido por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, cuyas unidades están unidas entre sí a través de enlaces  $\beta$ -1-6. Por lo general, el quitosano es producido por desacetilación de la quitina, un homopolisacárido de unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas entre sí a través de enlaces  $\beta$ -1-6. La quitina se encuentra sobre todo en los caparazones de crustáceos o fuentes vegetales.

50 [0027] Preferiblemente, el porcentaje de acetilación de polisacáridos de quitosano presentes en la partícula de quitosano de la invención, que es el número de unidades acetiladas en un polisacárido con respecto al número total de unidades en el polisacárido, es inferior al 25%. La partícula de quitosano de la invención está formada de quitosano de alto peso molecular, es decir polisacáridos de quitosano cuyo peso molecular promedio es preferiblemente mayor que 300 kDa, y cuya viscosidad es de al menos 800 mPa.s (en la que la viscosidad se mide según el procedimiento de Brookfield bien conocido con una solución al 1% de los polisacáridos de quitosano en 55 ácido acético al 1%).

[0028] El tamaño de la partícula quitosano cargada es de 1  $\mu$ m a 3  $\mu$ m.

60 [0029] El potencial zeta de la partícula de quitosano cargada es preferiblemente de más de 2,5 mV, más preferiblemente de 6 mV a 9 mV, y lo más preferiblemente de aproximadamente 7,3 mV.

65 [0030] El potencial zeta de una partícula refleja la carga de la superficie de la partícula. Corresponde a la diferencia de carga eléctrica entre el medio de dispersión en el que la partícula está en reposo y la capa densa de iones que rodea la partícula. El potencial zeta está especialmente definido por Veronesi et al. Toxicol Appl Pharmacol 2002; 178: 144-154.

**[0031]** El tamaño y el potencial zeta de la partícula de quitosano cargada de la invención se pueden medir por cualquier procedimiento adecuado. Preferiblemente, se miden con el siguiente aparato: Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

5 **[0032]** El antígeno se puede cargar sobre la partícula de quitosano de la invención según cualquier procedimiento adecuado. Sin embargo, el antígeno está preferiblemente reticulado a la partícula de quitosano de la invención. Numerosos procedimientos bien conocidos para la reticulación del antígeno a la partícula de quitosano están disponibles para un experto en la técnica dependiendo de la naturaleza del antígeno. Cuando el antígeno es una proteína, se puede mencionar en particular la reticulación iónica, por ejemplo usando tripolifosfato o genipina, o reticulación química, por ejemplo usando glutaraldehído, NaOH, o éter diglicídico de etilenglicol (por ejemplo, tal como se utiliza por Ko et al. Int J Pharm 2002; 249: 165-174). A modo de ejemplo, la partícula de quitosano cargada de la invención puede prepararse mediante un procedimiento que comprende:

10 - disolver el quitosano de alto peso molecular (por ejemplo disponible de Sigma-Aldrich bajo la referencia 419419) en una solución acuosa de ácido acético;

15 - añadir el antígeno a la solución;

- reticular el antígeno al quitosano.

*Composiciones inmunoterapéuticas, medicamentos y procedimientos para prevenir o tratar una reacción patológica del sistema inmunitario de una manera específica de antígeno*

20 **[0033]** Tal como se pretende en el presente documento, una "reacción patológica del sistema inmunitario de un individuo" se refiere a una reacción inmunitaria que se dirige contra tejidos o células del organismo que alberga dicho sistema inmunitario.

25 **[0034]** Dicha reacción patológica se selecciona en particular del grupo que consiste en alergia, tal como asma, enfermedad autoinmune o el rechazo del injerto.

**[0035]** En el contexto de la invención, alergia se refiere a asma o a las alergias debido a los alérgenos definidos anteriormente.

30 **[0036]** En el contexto de la invención, una enfermedad autoinmune, en particular, se refiere a la diabetes tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, y a las enfermedades debidas a los autoantígenos definidos anteriormente.

35 **[0037]** Tal como se pretende en el presente documento, el término "inmunoterapéutico" se refiere a la capacidad de una sustancia para prevenir o para tratar una reacción patológica del sistema inmunitario.

**[0038]** En el contexto de la invención, los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento", significa invertir, aliviar, o inhibir la evolución de una reacción patológica del sistema inmunitario o uno o más síntomas de la misma.

40 **[0039]** En el contexto de la invención, los términos "prevenir" o "prevención", significa que impide la aparición de una reacción patológica del sistema inmunitario o uno o más síntomas de la misma.

45 **[0040]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "individuo" indica preferiblemente un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un individuo según la presente invención es un humano.

50 **[0041]** "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra cuando se administran a un animal, o un ser humano, según sea apropiado.

55 **[0042]** Tal como se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las partículas de quitosano cargadas según la presente invención, se contempla su uso en las composiciones inmunoterapéuticas, en los medicamentos, o para la aplicación de los procedimientos para prevenir o tratar una reacción patológica del sistema inmunitario en un individuo según la presente invención. También se pueden incorporar en las composiciones principios activos suplementarios.

60 **[0043]** Se cree que las propiedades inmunoterapéuticas particulares de la partícula de quitosano cargada de la invención surgen de su tamaño y carga positiva que, de forma inesperada y en particular, favorecen la captación y el procesamiento del antígeno con el que está cargado, por la mucosa, en particular oromucosa, más particularmente células sublinguales, tales como las células dendríticas, favoreciendo de este modo la inducción de tolerancia específica de antígeno.

65 **[0044]** Además, la partícula de quitosano de la invención es mucoadhesiva. La mucoadhesividad permite el contacto

estrecho y prolongado con una mucosa, en particular una mucosa de la cavidad oral, y más particularmente la mucosa sublingual, mejorando así la inducción de tolerancia específica de antígeno.

5 [0045] Preferiblemente, la partícula de quitosano cargada, la composición inmunoterapéutica, o el medicamento de la invención, es para ser administrado por la vía de la mucosa, más preferiblemente por vía bucal, y lo más preferiblemente, por vía sublingual. Como tal, la composición inmunoterapéutica y el medicamento se formulan preferiblemente en una forma adaptada para tales vías de administración.

10 [0046] La administración por la mucosa indica cualquier procedimiento de administración, en la que la formulación en parte o en su totalidad entra en contacto con una mucosa. Mucosa se refiere al tejido epitelial que reviste las cavidades internas del cuerpo. La superficie de la mucosa puede ser seleccionada del grupo que consiste en superficie nasal, bucal, ocular, auditiva, del tracto pulmonar, uretral, del tracto oral, vaginal, digestivo y rectal.

15 [0047] La administración bucal comprende cualquier procedimiento de administración, en el que la formulación en parte o en su totalidad entra en contacto con la mucosa de la cavidad oral y/o la faringe del paciente.

[0048] La administración bucal incluye en particular administraciones sublinguales, perlinguales (es decir, a través de la mucosa de la lengua) y orales.

20 [0049] Las partículas de quitosano cargadas, las composiciones inmunoterapéuticas o los medicamentos según la presente invención se pueden administrar en diversas formas, tales como formas dispersas, por ejemplo en suspensiones o geles, o como formas secas, por ejemplo en polvos, comprimidos, cápsulas, lyoc, o formas adecuadas para ser administradas en un dispositivo de medida de la dosificación.

25 [0050] En el marco de procedimientos para prevenir o tratar reacciones patológicas del sistema inmunitario, las composiciones inmunoterapéuticas o los medicamentos, según la presente invención, pueden comprender además un adyuvante para potenciar la inducción de tolerancia específica de antígeno. Cualquier adyuvante convencional o exploratorio, sintético o biológico, para la vacunación, incluyendo la enterotoxina lábil al calor (LT), toxina del cólera (CT), subunidad B de la toxina del cólera (CTB), liposomas polimerizados, toxinas mutantes, bacterias probióticas, oligonucleótidos, ARN, ARNsi, ADN, lípidos, puede asociarse a las partículas de quitosano cargadas según la  
30 presente invención para mejorar la inducción de tolerancia específica de antígeno. Para la administración bucal, los adyuvantes pueden ser, preferiblemente, una bacteria seleccionada entre un *Bifidobacterium* y una bacteria de ácido láctico, o una combinación de un corticosteroide con la vitamina D3 o cualquier metabolito o análogo de éste último.

35 [0051] En el marco de procedimientos para prevenir o tratar reacciones patológicas del sistema inmunitario, las composiciones inmunoterapéuticas o los medicamentos, según la presente invención, el régimen de administración se puede repetir durante un período de menos de 6 semanas a hasta tres años.

40 [0052] Además, la prevención o el tratamiento se pueden efectuar con una pluralidad de diferentes antígenos. Esto se puede conseguir ya sea con un tipo de partículas de quitosano de la invención cargadas con una pluralidad de antígenos o con una pluralidad de partículas de quitosano de la invención que contienen uno o más antígenos cada una.

45 [0053] Preferiblemente, en el marco de procedimientos para prevenir o tratar reacciones patológicas del sistema inmunitario, en las composiciones inmunoterapéuticas o los medicamentos, según la presente invención, la dosis de alérgeno comprendido en las partículas de quitosano cargadas de la invención varía desde 0,1 µg a 100 mg.

[0054] La invención se ilustrará adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplos.

## 50 Descripción de las figuras

### Figura 1

55 [0055] La OVA formulada en partículas de quitosano es bien reconocida por anticuerpos específicos. La OVA soluble u OVA formulada con quitosano de PM alto o medio se detectaron por ELISA (ensayo de inhibición) usando sueros de ratones inmunizados con OVA.

### Figura 2, figura 3, figura 4, figura 5 y figura 6

60 [0056] Ambas partículas de quitosano mejoran la captación y el procesamiento de OVA por BMDC, pero solo las partículas de quitosano con alto PM mejoran el procesamiento de OVA por las DC orales. Para estudios de captación, se incubaron FITC-OVA o FITC-OVA formulada con quitosano de alto PM (Figura 2) o FITC-OVA formulada con quitosano de PM medio (Figura 3) con BMDC durante 15, 60 o 240 min, a 37°C o 4°C. Para ensayos de procesamiento, se incubaron DQ-OVA o DQ-OVA formulada con quitosano de alto PM o DQ-OVA formulada con  
65 quitosano de PM medio con BMDC (Figuras 4 y 5) o DC orales purificadas (Figura 6), a una concentración final de 10 µg/ml, durante 3 h (BMDC) o 1 h (DC orales) a 37°C o 4°C. Las células se analizaron a continuación usando un

citómetro de flujo FC500.

#### Figura 7, figura 8, figura 9 y figura 10

5 **[0057]** Las partículas de quitosano de alto peso molecular aumentan la proliferación de células T y la secreción de IFN- $\gamma$ /IL-10 *in vitro*. Se marcaron linfocitos T CD4+ específicos de OVA de ratones DO11.10 con CFSE y se cocultivaron con BMDC y OVA (1,5 o 15  $\mu$ g/ml), OVA formulada con quitosano de PM alto o medio (1,5 o 15  $\mu$ g/ml), o las formulaciones de quitosano solo. Después de 3 días, se recogieron las células, se tiñeron con mAb PE-KJ1.26 y el contenido CFSE se analizó en las células T de respuesta utilizando un citómetro de flujo FC500 (Figura 7). Se midieron IFN- $\gamma$  (Figura 8), IL-10 (Figura 9) e IL-5 (Figura 10) mediante el ensayo de CBA en sobrenadantes de cultivos de células correspondientes a 15  $\mu$ g/ml de concentraciones de OVA.

#### Figura 11

15 **[0058]** Las partículas de quitosano de alto peso molecular mejoran el cebado de células T *in vivo* en LN cervicales. Las células T CD4+ de DO11.10 marcadas con CFSE purificadas se transfirieron de manera adoptiva en ratones BALB/c en el día 0. Veinticuatro horas después, los ratones fueron tratados por vía sublingual con OVA soluble u OVA formulada con quitosano (PM alto o medio). Los animales de control se trataron con PBS estéril o formulaciones de quitosano solo. En el día 10, se extrajeron los LN cervicales. Las células proliferantes se detectaron mediante citometría de flujo (datos representativos de 3 a 5 ratones por grupo).

#### Figura 12, figura 13, figura 14, figura 15, figura 16, figura 17, figura 18 y figura 19

25 **[0059]** La SLIT terapéutica con OVA formulada con quitosano de alto PM, no con OVA formulada con quitosano de PM medio, reduce la AHR establecida, la inflamación pulmonar y las respuestas Th2 específicas de OVA en los LN mediastínicos. Todos los ratones se sensibilizaron mediante inyecciones intraperitoneales con OVA/alumbre seguido de una estimulación con aerosol (Figura 12). Los ratones BALB/c se trataron a continuación por vía sublingual con PBS, OVA, OVA formulada con quitosano (PM alto o medio) o quitosano solo. Después de la estimulación con aerosol de OVA, se investigaron la AHR, la inflamación pulmonar y las respuestas celulares. La AHR se determinó midiendo el índice de Penh de todos los grupos de ratones (Figura 13) (- = media). \*  $p < 0,05$  en comparación con los ratones insensibilizados con PBS, NS: No significativo.  $n = 7$  a 8. Para la histología de tejido (Figura 14), se muestran secciones de pulmón en parafina representativas teñidas con HES de ratones insensibilizados ya sea con PBS, OVA, OVA formulada con quitosano de alto peso molecular o quitosano solo (ampliación de 100 veces). Los eosinófilos se contaron en BAL recogido de los ratones tratados con PBS, OVA, OVA formulada con quitosano de alto PM o quitosano solo (Figura 15). La media  $\pm$  SE.  $n = 7$  a 8. \* $p < 0,05$  en comparación con los ratones insensibilizados con PBS, NS: No significativo. Para el análisis de respuestas de LN, se midieron las secreciones de IL-13, IL-5 e IL-10 en LN mediastínicos (figura 16, figura 17, figura 18) y de cuello uterino (Figura 19) mediante el ensayo de CBA. La media  $\pm$  SE.  $n = 6$  a 8.

#### 40 Ejemplos

##### Animales, medio de cultivo, reactivos y formulaciones

45 **[0060]** Se adquirieron ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad de Charles River (L'Arbresle, Francia) y se mantuvieron en una dieta libre de OVA. Ratones hembra transgénicos con receptor de células T (TCR) específico de OVA DO11.10 (TCR) con aproximadamente 50% de sus células T CD4 + expresando un TCR específico para el fragmento de péptido 323-339 de OVA (Murphy et al Science 1990; 250: 1720-1723), se criaron en el Centre d'Exploration et de Recherche Fonctionnelle Experimentale (Evry, Francia). Se aplicaron los niveles internacionales de las normas éticas de la manipulación de los animales.

50 **[0061]** El medio completo para el cultivo de células de LN, células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC), células dendríticas orales (DC) y células T específicas de OVA de ratones DO11.10 consistió en RPMI 1640 suplementado con suero de ternera fetal al 10%, 1% de L-glutamina, 200 U/ml de penicilina y 200  $\mu$ g/ml de estreptomycin (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA). Se obtuvieron GM-CSF e IL-4 murinos recombinantes de Gentaur (Bruselas, Bélgica). La solución salina tamponada con fosfato (PBS) y el alumbre se adquirieron de Lonza (Basel, Suiza) y Pierce (Rockford, IL), respectivamente. El OVA de grado V con bajo contenido de endotoxina se adquirió de Sigma (St. Louis, MO) y se purificó adicionalmente sobre un gel de eliminación de endotoxinas (Pierce) como se describe anteriormente (10). Las concentraciones de endotoxina residual determinadas mediante ensayo de Endocromo-K (R1708K, Charles River, Wilmington, MA) fueron siempre menores de 0,1 UE/ $\mu$ g de proteína.

60 **[0062]** A continuación, se realizaron comparaciones promedio mediante pruebas t de Student. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo.

#### Ejemplo 1

65

**Caracterización de partículas de quitosano**

[0063] Las partículas se prepararon a partir de quitosano de peso molecular alto y medio, que difieren en la longitud de cadena del polímero.

[0064] Brevemente, para preparar partículas de quitosano cargadas con OVA, se disolvieron 0,05 g de quitosano, ya sea con peso molecular (PM) alto o medio (419419 o 448877 de Sigma, respectivamente), en 25 ml de solución de ácido acético acuoso (1%). La suspensión se homogeneizó con un homogeneizador Ultra Turrax T18 (IKA, Staufen, Alemania) a 9500 rpm durante 2 min, y el pH se ajustó a 5 con una solución de NaOH 1 N. A continuación, se añadieron 30 ml de una solución de OVA 20 mg/ml a 0,75 ml/min bajo agitación magnética a temperatura ambiente, y se realizó la reticulación después de la adición de 10 ml de una solución acuosa de tripolifosfato de 0,1% (Sigma).

[0065] Se analizaron tamaño y carga (potencial zeta) de partículas de quitosano usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). El tamaño de partículas de OVA con quitosano de alto PM y PM medio eran de 1,0 – 3,0  $\mu\text{m}$ , y 300 - 800 nm, respectivamente. Las partículas de OVA con quitosano de alto PM y PM medio mostraron un potencial zeta de 7,3 +/- 0,9 mV y 1,8 +/- 0,6 mV, respectivamente.

[0066] Para verificar la antigenicidad de OVA formulada en quitosano, la capacidad de OVA sola o formulada con quitosano para unirse a anticuerpos específicos de OVA se midió usando un ensayo de inhibición ELISA con sueros de ratones inmunizados con OVA.

[0067] La OVA purificada (0,2  $\mu\text{g}$ ) se usó para recubrir durante la noche a 4°C en placas ELISA (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Después de etapas de lavado y de bloqueo, se añadieron sueros de ratones inmunizados con OVA (1/5000) y OVA o diluciones de OVA formuladas con quitosano (1/2 a 1/800000) y se incubaron durante 2h30 a temperatura ambiente. Las placas se lavaron, se añadieron anticuerpos IgG anti-ratón de oveja conjugado con peroxidasa (dilución 1/1000, Sigma) durante 1 hora a 37°C, y se utilizó ortofenilendiamina (OPD) como sustrato (Sigma). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 M y se determinaron las densidades ópticas usando un lector de placas de ELISA a 492 nm (Labsystems, Helsinki, Finlandia).

[0068] Como se muestra en la **Figura 1**, la OVA formulada en cualquiera de las partículas de quitosano con PM alto o medio permanecieron bien reconocidos por anticuerpos específicos.

**Ejemplo 2****Las partículas de quitosano mejoran la captación de OVA y procesamiento por las células dendríticas**

[0069] Para investigar el efecto de las partículas de quitosano en la captación de alérgeno, los estudios in vitro se realizaron con OVA marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y OVA con FITC formulada con quitosano.

[0070] Se generaron BMDC a partir de fémures y tibias de ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de vida, tal como se describe anteriormente (Inaba et al J Exp Med 1992; 176: 1693-1702), y se confirmó que expresaban CD11c (con pureza > 90%) por análisis con citometría de flujo (citómetro de flujo FC500, Beckman Coulter, Villepinte, Francia). Para los ensayos de captación de antígenos, las células se suspendieron a  $5 \times 10^4$ /ml en medio completo. Se añadieron OVA marcado con FITC u OVA con FITC formulado con quitosano a una concentración final de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , se incubaron y las células durante 15 min, 1 h o 4 h, a 37°C o 4°C.

[0071] Como se muestra en las **figuras 2 y 3**, las partículas de quitosano de PM alto y medio mejoraron drásticamente la captación de OVA por BMDC en comparación con OVA soluble. Cabe indicar que una fluorescencia similar se detectó con OVA con FITC formulado con quitosano a 4°C.

[0072] Los ensayos de procesamiento in vitro por BMDC se realizaron usando DQ-OVA (Invitrogen) y DQ-OVA formulada con quitosano que emiten fluorescencia después de la escisión proteolítica. Brevemente, se suspendieron  $5 \times 10^4$ /ml de células en medio completo, y se añadieron 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DQ-OVA o DQ-OVA formulado con quitosano durante 3 horas a 37°C o 4°C. Para ambos experimentos, las células se lavaron a continuación dos veces con HBSS frío y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como la intensidad de fluorescencia promedio.

[0073] Tal como se presenta en las **figuras 4 y 5**, ambas partículas de quitosano mejoraron significativamente el procesamiento de OVA por BMDC en comparación con OVA soluble.

[0074] Para investigar más la captación de OVA formulada con quitosano por APC, los inventores utilizaron DC mieloides murinas CD11 b+ CD11 c- aisladas de los tejidos orales.

[0075] En resumen, se extrajeron los tejidos de suelo bucal y lingual de ratones BALB/c sin tratar y tratados durante 45 minutos a 37°C con 400 U/ml de colagenasa de tipo IV (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de

ADNasa I (Roche Diagnostic) y 2 U/ml de dispasa (Invitrogen) en medio RPMI. Después de bloquear la actividad enzimática residual con EDTA 5 mM en PBS, los tejidos orales se disociaron en PBS. Suspensiones de células únicas se marcaron con anticuerpos anti-CD11b marcados con ficoeritrina (PE) y anticuerpos anti-CD11 marcados con alofococianina (APC) (ambos de BD Biosciences, San Jose, CA). Se aislaron células CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>, que representan el subconjunto principal de células dendríticas orales, utilizando un clasificador celular MoFlo (Dako, Glostrup, Dinamarca). Las células fueron más del 99% puras, tal como se evaluó por análisis de citometría de flujo. Las DC orales (10<sup>4</sup>/pocillo en 100 µl de medio completo) se incubaron con DQ-OVA o DQ-OVA formulada con quitosano a una concentración final de 10 µg/ml. Después de 1 h a 37°C o 4°C, las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como la intensidad de fluorescencia promedio.

**[0076]** Como se muestra en la **Figura 6**, solo la OVA formulada con quitosano de alto PM mejoró el procesamiento de OVA por DC orales.

### Ejemplo 3

#### **OVA formulada con quitosano de alto PM mejora la proliferación de células T in vitro y la secreción de IFN- $\gamma$ /IL-10**

**[0077]** Para determinar si la captación superior de la OVA formulada con quitosano por DC mejoró la proliferación de células T y la secreción de citoquinas subsecuentes, los linfocitos T sin tratar CD4<sup>+</sup> específicos de OVA de ratones DO11.10 se marcaron con éster succinimidílico de diacetato con carboxifluoresceína (CFSE) y se cocultivaron con BMDC y medio solo, OVA, quitosano solo u OVA formulada con quitosano.

**[0078]** En resumen, se purificaron células T CD4<sup>+</sup> de bazos de ratones DO11.10 mediante separación de microesferas magnéticas usando un kit de aislamiento de CD4 negativo de ratón (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las preparaciones de células T resultantes contienen células T CD4<sup>+</sup> sin tratar al 95-99% (posteriormente denominadas células DO11.10 T). Las células DO11.10 T se marcaron con 1 µM de CFSE (Invitrogen) durante 5 min a 37°C en PBS y se lavaron dos veces. Las células DO11.10 T marcadas con CFSE se incubaron a continuación (por duplicado) con BMDC y OVA (1,5 o 15 µg/ml), OVA formulada con quitosano (1,5 o 15 µg/ml), o quitosano solo durante 3 días. Las células T específicas de OVA se tiñeron con los mAb PE-KJ1.26 anticlonotípico (BD Biosciences) y las células T proliferantes fueron evaluadas por análisis de citometría de flujo, como células con una disminución de la fluorescencia asociada con CFSE.

**[0079]** Se midieron IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo (que corresponden a concentraciones de OVA de 15 µg/ml) utilizando un kit Cytometric Bead Array (CBA) Flex (BD Biosciences). Las mediciones se realizaron en comparación con una curva estándar de 10 puntos obtenida mediante diluciones en serie de los patrones liofilizados reconstituidos. Se obtuvo una mezcla de reactivos mezclando 10 µl de cada suspensión de microesferas de captura murinas. Esta mezcla se agitó vorticialmente vigorosamente y se incubó en la oscuridad durante 90 minutos a temperatura ambiente con muestras de prueba o diluciones patrón. A continuación, se añadieron 50 µl del reactivo de detección marcado con ficoeritrina (PE) a cada pocillo y se incubaron en la oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente. Las microesferas se lavaron, se resuspendieron en 200 µl de tampón y se analizaron mediante citometría de flujo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**[0080]** Como se muestra en la **Figura 7**, el direccionamiento de DC con OVA formulada con quitosano de alto PM mejoró la proliferación de células T en comparación con OVA sola. Esto se asoció con un aumento espectacular de la secreción de IFN- $\gamma$  (**Figura 8**) e IL-10 (**Figura 9**) por las células T, mientras que no se observó impacto en la secreción de IL-5 (**Figura 10**). La incubación con OVA formulada con quitosano con PM promedio indujo una proliferación más baja de células T (**Figura 7**), así como pequeñas secreciones de IFN- $\gamma$  y IL-10 (**figuras 8 y 9**) cuando se comparó con OVA soluble. No se observaron cambios detectables en las secreciones de IL-5 (**Figura 10**). No se detectó secreción de citoquinas en ausencia de células T CD4<sup>+</sup> DO11.10.

### Ejemplo 4

#### **El cebado de células T se produce en los LN cervicales después de la administración sublingual de OVA formulada con quitosano de alto PM**

**[0081]** Para evaluar si las partículas de OVA con quitosano podrían mejorar el cebado de células T en los LN de drenaje después de la administración sublingual, las células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 específicas de OVA marcadas con CFSE como se ha descrito anteriormente, se transfirieron de manera adoptiva en ratones BALB/c antes de SLIT.

**[0082]** Brevemente, se transfirieron 5 x 10<sup>6</sup> células de manera adoptiva mediante inyección intravenosa retro-orbital en ratones BALB/c en el día 0. Veinticuatro horas después, los ratones (de 3 a 5 ratones por grupo) se trataron mediante ruta sublingual, ya sea con OVA soluble u OVA formulada con quitosano (500 µg de OVA por dosis). Los animales de control se trataron con PBS estéril o formulaciones con quitosano solo. Los LN cervicales se recuperaron en el día 10. Las células T específicas de OVA se tiñeron con el mAb PE-KJ1.26 anticlonotípico (BD

Biosciences) y las células proliferantes fueron evaluadas por análisis de citometría de flujo como células con fluorescencia disminuida.

[0083] Como se muestra en la figura 11, la proliferación de células T era apenas detectable en los LN cervicales de ratones tratados por vía sublingual, ya sea con PBS, quitosano de alto peso molecular o quitosano de PM medio, con sólo el 6,8%, 6,3%, y 5,7% de células T proliferantes, respectivamente. En cambio, la administración sublingual de OVA indujo una proliferación fácilmente detectable de células T en los LN cervicales, en el intervalo de 34,5%. Curiosamente, el uso de OVA formulada de quitosano con alto PM aumentó fuertemente la proliferación de células T (con un máximo de 46,7% de células T proliferantes), mientras que OVA formulada con quitosano de PM medio indujo una proliferación de células T inferior (15,8%) en comparación con OVA sola.

### Ejemplo 5

#### Tratamiento sublingual terapéutico con OVA formulada con quitosano de alto PM reduce la AHR establecida

[0084] Dada la evidencia de que las partículas de quitosano se podrían utilizar para dirigir el antígeno en DC, se ensayaron en un modelo murino de SLIT que se basaba en ratones sensibilizados con OVA (Razafindratsita et al J Allergy Clin Immunol 2007; 120: 278-285). Esos ratones muestran hiperreactividad severa de las vías respiratorias (AHR), inflamación pulmonar que se caracteriza por una alta infiltración celular y la hiperproducción de moco, y la respuesta inmune sistémica de Th2 específica de OVA.

[0085] En resumen, se realizó la sensibilización de ratones BALB/c mediante dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) a intervalos de 14 días con 10 µg de OVA adsorbida en 2 mg de Al(OH)<sub>3</sub> administrado en un volumen de 100 µl. Esto fue seguido por una estimulación con aerosoles 20 min con OVA al 1% p/v en 4 días consecutivos usando un sistema de suministro de aerosol (Buxco Europe Ltd, Winchester, Reino Unido). Los ratones se trataron entonces por vía sublingual dos veces a la semana durante 2 meses, mediante la aplicación de soluciones (OVA u OVA formulada con quitosano, 500 µg por dosis) debajo de la lengua, mientras que se sostenían los animales en su parte posterior (durante 1 minuto) para evitar la deglución (**Figura 12**). Los animales de control se desensibilizaron de forma simulada con PBS estéril o formulaciones de quitosano solo. Dos días después del tratamiento, los ratones se estimularon con aerosoles de OVA (1% p/v) en 2 días consecutivos.

[0086] Las mediciones de AHR se realizaron 24 h después de la última estimulación mediante pletismografía de cuerpo completo (Buxco) como se describe en otra parte (Hamelmann et al., Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 766-775). La resistencia de las vías respiratorias se expresó como una pausa mejorada (Penh). Se obtuvo un índice de Penh, expresado como un aumento relativo a la resistencia basal de la vía aérea, dividiendo el Penh medido después de la exposición a 100 mg/ml de metacolina inhalada con el Penh medido después de la inhalación de PBS nebulizado.

[0087] El tratamiento con OVA formulado con quitosano de alto PM drásticamente redujo AHR (Figura 13), dando lugar a valores de índice Penh comparables a los de los ratones no sensibilizados sanos, mientras que el tratamiento con OVA soluble tuvo un efecto moderado sobre la AHR. Por el contrario, el tratamiento con OVA formulada con quitosano de PM medio no tuvo ningún efecto beneficioso sobre la AHR. Cabe indicar que las partículas de quitina coadministradas con OVA no redujeron la AHR más que la OVA sola.

### Ejemplo 6

#### El tratamiento sublingual terapéutico con OVA formulada con quitosano de alto peso molecular reduce la inflamación bronquial

[0088] La inflamación bronquial se evaluó posteriormente en todos los grupos

[0089] Para la histología de tejido, los pulmones se recuperaron y se fijaron en formalina tamponada con fosfato-zinc y se embebieron en cera de parafina. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina, eosina y Safran (HES) para la determinación de infiltrados celulares. Se realizó una evaluación semicuantitativa de inflamación perivascular, peribronquial y alveolar sobre muestras codificadas.

[0090] Para el análisis de las células inflamatorias en lavados bronco-alveolares (BAL), los ratones se anestesiaron 24 h después de la última estimulación con OVA mediante una inyección i.p. de una solución de pentobarbital (50 mg/kg de peso corporal). A continuación, el BAL se realizó con 600 µl de PBS. El fluido del BAL se centrifugó a 800 g durante 10 minutos a 4°C. Los sedimentos celulares se resuspendieron en PBS, se centrifugaron sobre un portaobjetos de vidrio mediante citocentrifugación y después se fijaron y se visualizaron después de tinción de May-Grünwald Giemsa (Reagents RAL, Martillac, Francia). Los eosinófilos se contaron mediante microscopía óptica con un aumento de x200.

[0091] La disminución observada de AHR después del tratamiento con OVA formulada con quitosano de alto peso molecular se asoció con una reducción en la inflamación bronquial y infiltrados celulares, tal como se muestra

mediante el análisis de secciones de tejido de pulmón (**Figura 14** y la **Tabla 1**).

**Tabla 1.** La SLIT terapéutica con OVA formulada con quitosano de alto peso molecular reduce la inflamación perivascular, peribronquial y alveolar. Los pulmones de ratones tratados con PBS, OVA, OVA formulada con quitosano de alto peso molecular o quitosano solo se extrajeron, se fijaron y se tiñeron con HES para la determinación de infiltrados celulares. Se realizó una evaluación semicuantitativa de inflamación perivascular, peribronquial y alveolar sobre muestras codificadas. Los datos se expresan como el número de animales que presentan signos de inflamación

Grupos	n	Inflamación perivascular			Inflamación peribronquial			Inflamación alveolar		
		-	+	++	-	+	++	-	+	++
PBS	7	1/7	5/7	1/7	1/7	5/7	1/7		4/7	3/7
OVA	7	4/7	3/7		4/7	3/7		1/7	6/7	
Quitosano	8	2/8	6/8		2/8	6/8		3/8	5/8	
Quitosano + OVA	8	7/8	1/8		7/8	1/8		6/8	2/8	

**[0092]** Esta reducción en la inflamación bronquial se correlacionó con una reducción significativa en los recuentos de eosinófilos en BAL en comparación con el tratamiento con OVA sola (**Figura 15**).

### Ejemplo 7

#### El tratamiento sublingual terapéutico con OVA formulada con quitosano de alto peso molecular reduce las respuestas Th2 específicas de OVA en LN mediastínicos

**[0093]** Las respuestas inmunitarias en LN mediastínicos y cervicales se evaluaron posteriormente en todos los grupos.

**[0094]** Para la evaluación de las respuestas de células T, se extrajeron los LN mediastínicos y cervicales, se aislaron las células, se sembraron a  $3 \times 10^5$  células por pocillo, y se estimularon con OVA (100  $\mu\text{g/ml}$ ) o medio solo. Las placas se incubaron durante 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  en 5% de  $\text{CO}_2/95\%$  de aire. Se midieron IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo usando un kit CBA Flex, tal como se describe anteriormente.

**[0095]** Los ratones tratados con OVA formulada con quitosano de alto PM mostraron una producción de IL-13 (**Figura 16**), IL-10 (**Figura 17**) e IL-5 (**Figura 18**) específica de OVA ligeramente inferior en LN mediastínico, en comparación con OVA sola. En cambio, se detectaron altos niveles de IL-10 en los LN cervicales, mientras que no se observó ninguna variación en ninguna de las citocinas Th2 (**Figura 19**). No se observaron cambios en la secreción de IFN- $\gamma$  y anticuerpos IgE o IgG específicos de OVA en suero en ninguno de los grupos (datos no mostrados).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición mucoadhesiva adaptada para prevenir y/o tratar una reacción patológica del sistema inmunitario de un individuo mediante la inducción de una tolerancia específica hacia al menos un antígeno implicado en dicha reacción patológica, que comprende partículas de quitosano cargadas con dicho al menos un antígeno implicado en la reacción patológica, siendo dicho antígeno una proteína, un polipéptido o un péptido,  
10 en la que el tamaño de las partículas de quitosano cargadas es de 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ , y las partículas de quitosano están formadas de quitosano cuya viscosidad es de al menos 800 mPa.s cuando se mide según el procedimiento de Brookfield con una solución al 1% de quitosano en ácido acético al 1%.
- 15 2. Composición mucoadhesiva, según la reivindicación 1, en la que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en un alérgeno, un autoantígeno y un antígeno específico de injerto.
3. Composición mucoadhesiva, según la reivindicación 1 ó 2, en la que el antígeno es un alérgeno.
- 20 4. Composición mucoadhesiva, según la reivindicación 3, en la que dicho alérgeno se selecciona del grupo que consiste en alérgenos de polen, alérgenos de ácaros, alérgenos de insectos, alérgenos de pelo y caspa animal y alérgenos alimentarios.
- 25 5. Composición inmunoterapéutica que comprende una composición mucoadhesiva, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.
6. Composición inmunoterapéutica, según la reivindicación 5, en forma de una suspensión, un gel, un polvo, un comprimido, una cápsula o un lyoc.
- 30 7. Composición inmunoterapéutica, según la reivindicación 5 ó 6, que comprende además un adyuvante para aumentar la inducción de tolerancia específica de antígeno.
- 35 8. Composición mucoadhesiva, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o composición inmunoterapéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, para utilizar en la prevención y/o el tratamiento de una reacción patológica del sistema inmunitario de un individuo mediante la inducción de una tolerancia específica hacia al menos un antígeno implicado en dicha reacción patológica, siendo dicho antígeno una proteína, un polipéptido o un péptido;  
en la que la reacción patológica se selecciona de alergia, enfermedad autoinmune o rechazo del injerto; y  
en la que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en un alérgeno, un autoantígeno y un antígeno específico de injerto.
- 40 9. Composición mucoadhesiva o composición inmunoterapéutica para utilizar, según la reivindicación 8, en las que el medicamento se administra por vía de las mucosas.
- 45 10. Composición mucoadhesiva o composición inmunoterapéutica para utilizar, según la reivindicación 8 ó 9, en las que el medicamento se administra por vía bucal.
11. Composición mucoadhesiva o composición inmunoterapéutica para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en las que el medicamento se administra por vía sublingual.

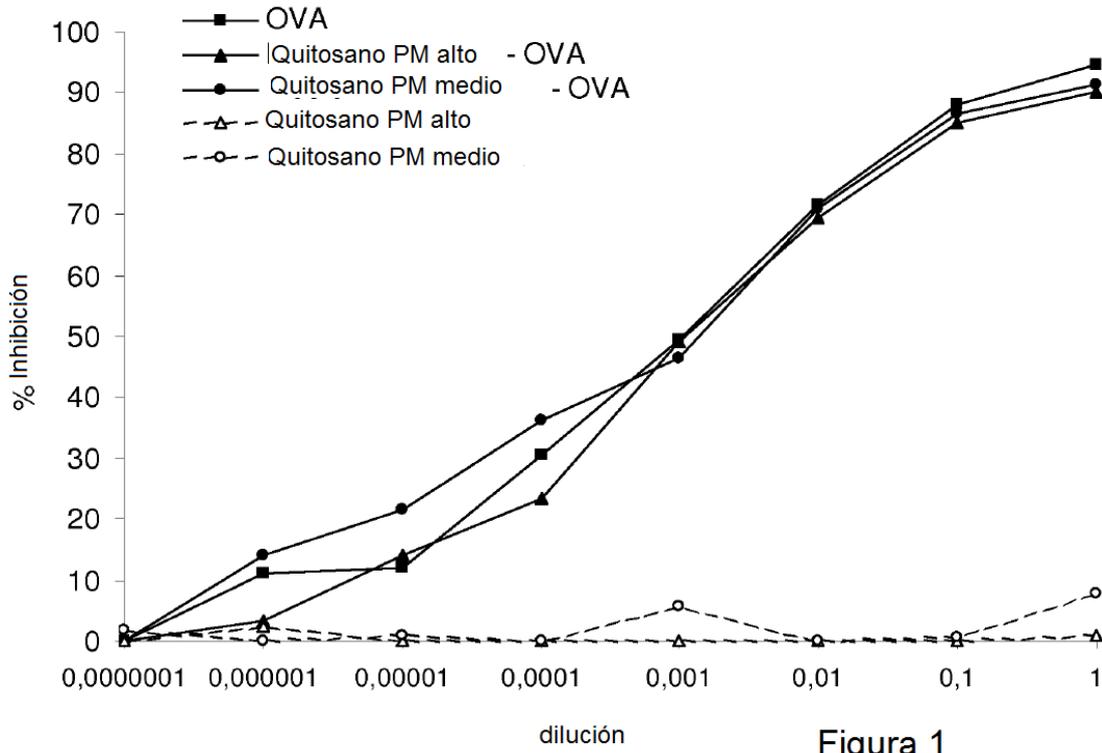


Figura 1

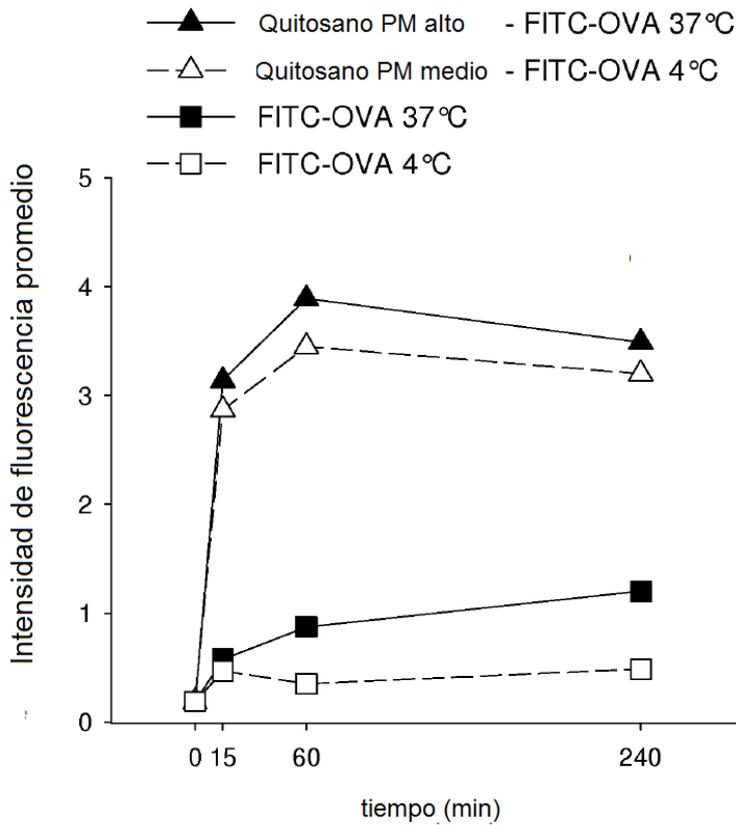


Figura 2

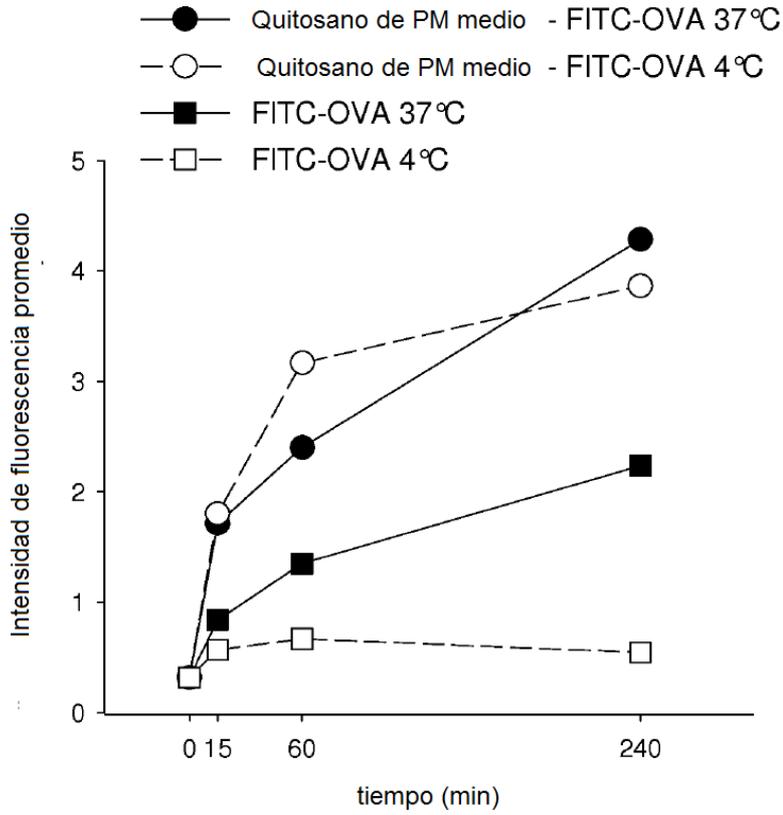


Figura 3

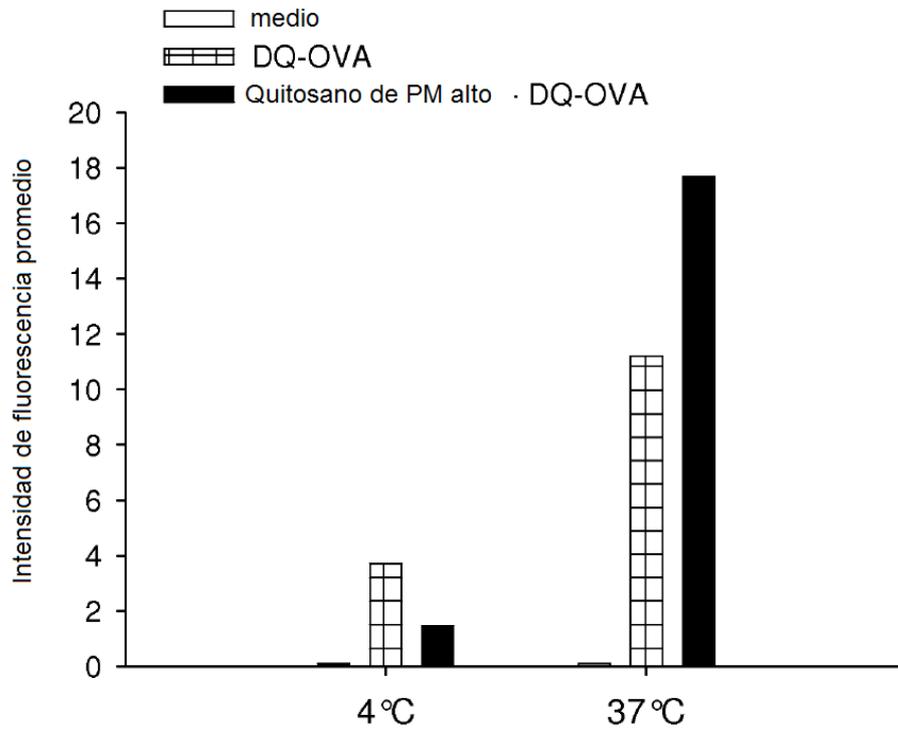


Figura 4

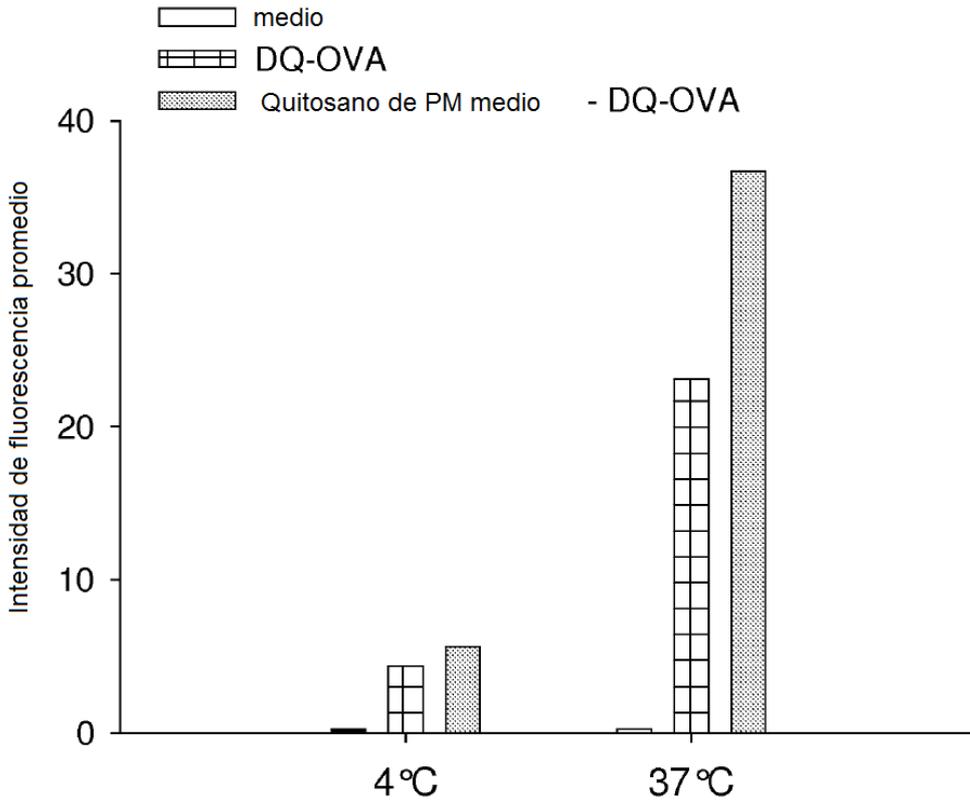


Figura 5

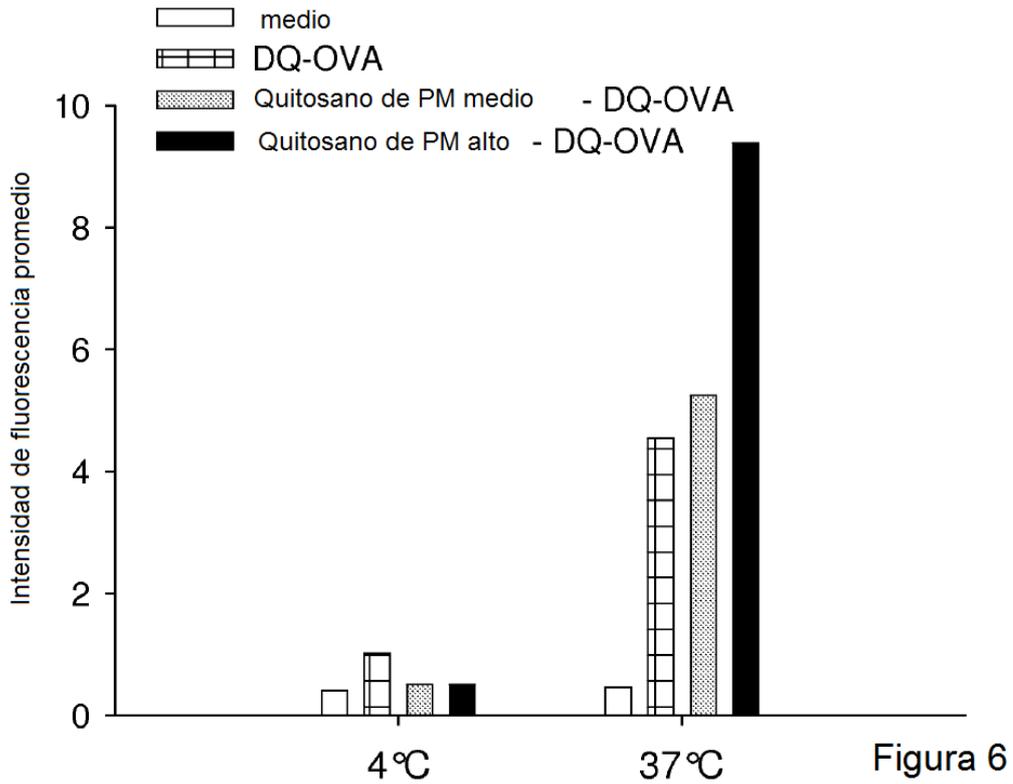


Figura 6

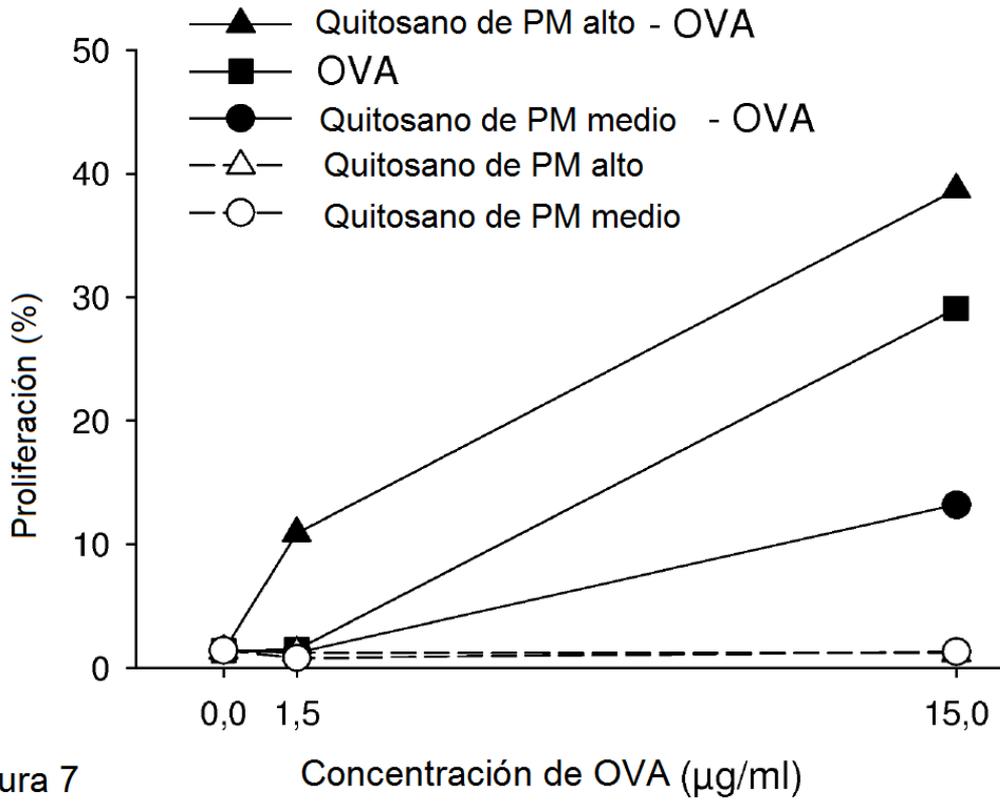


Figura 7

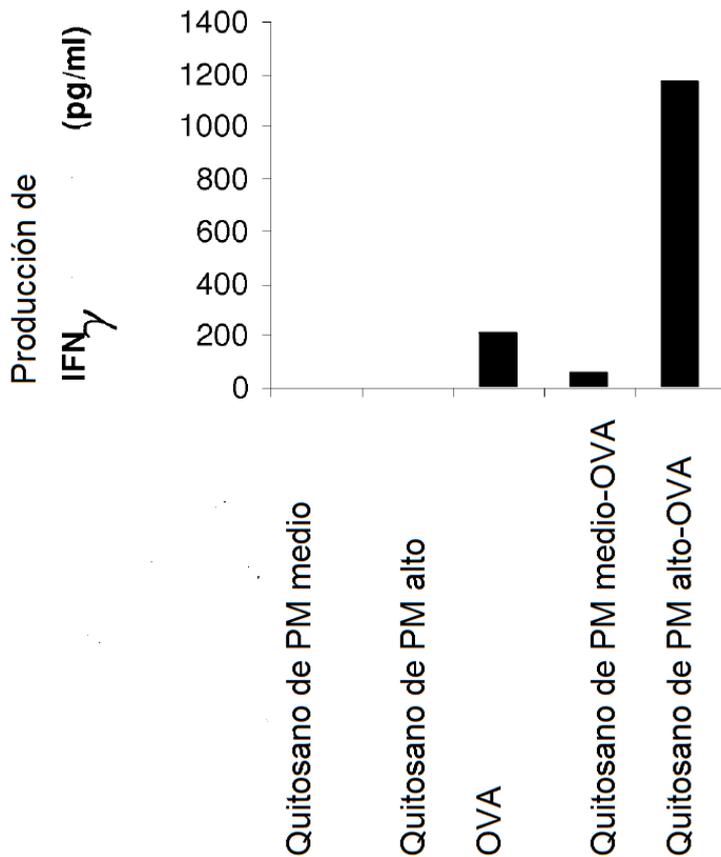


Figura 8

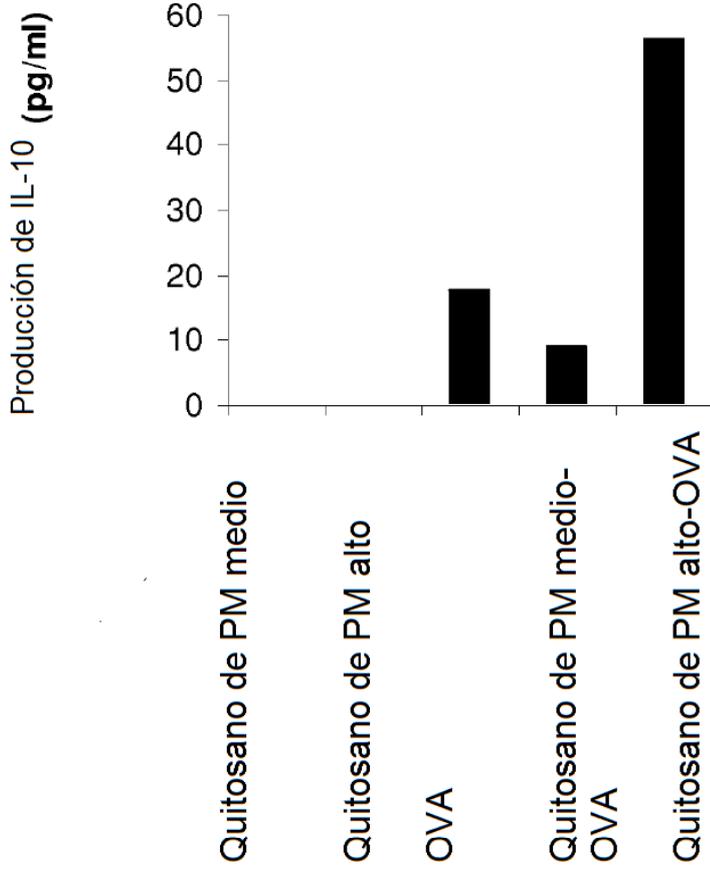


Figura 9

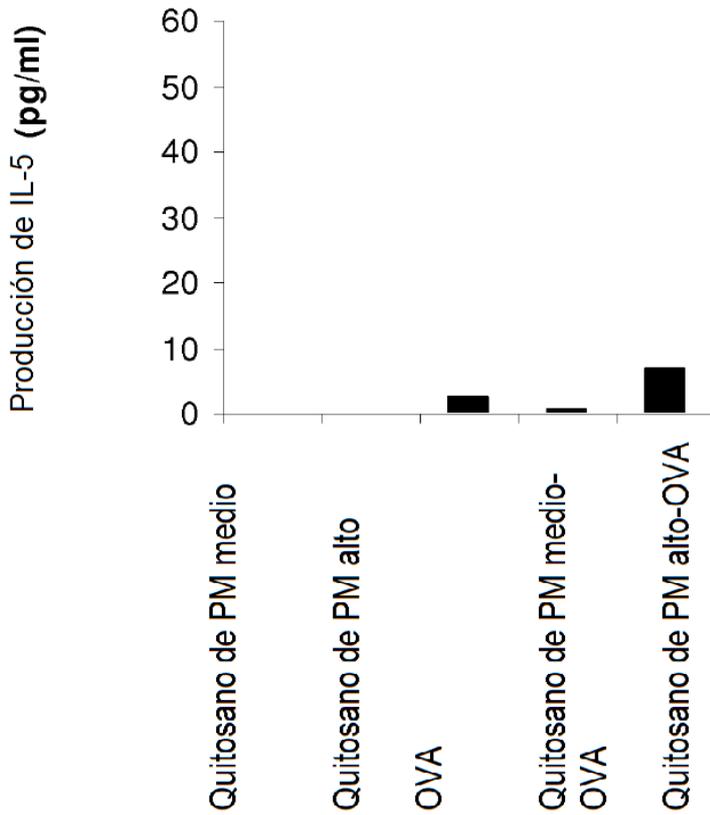


Figura 10

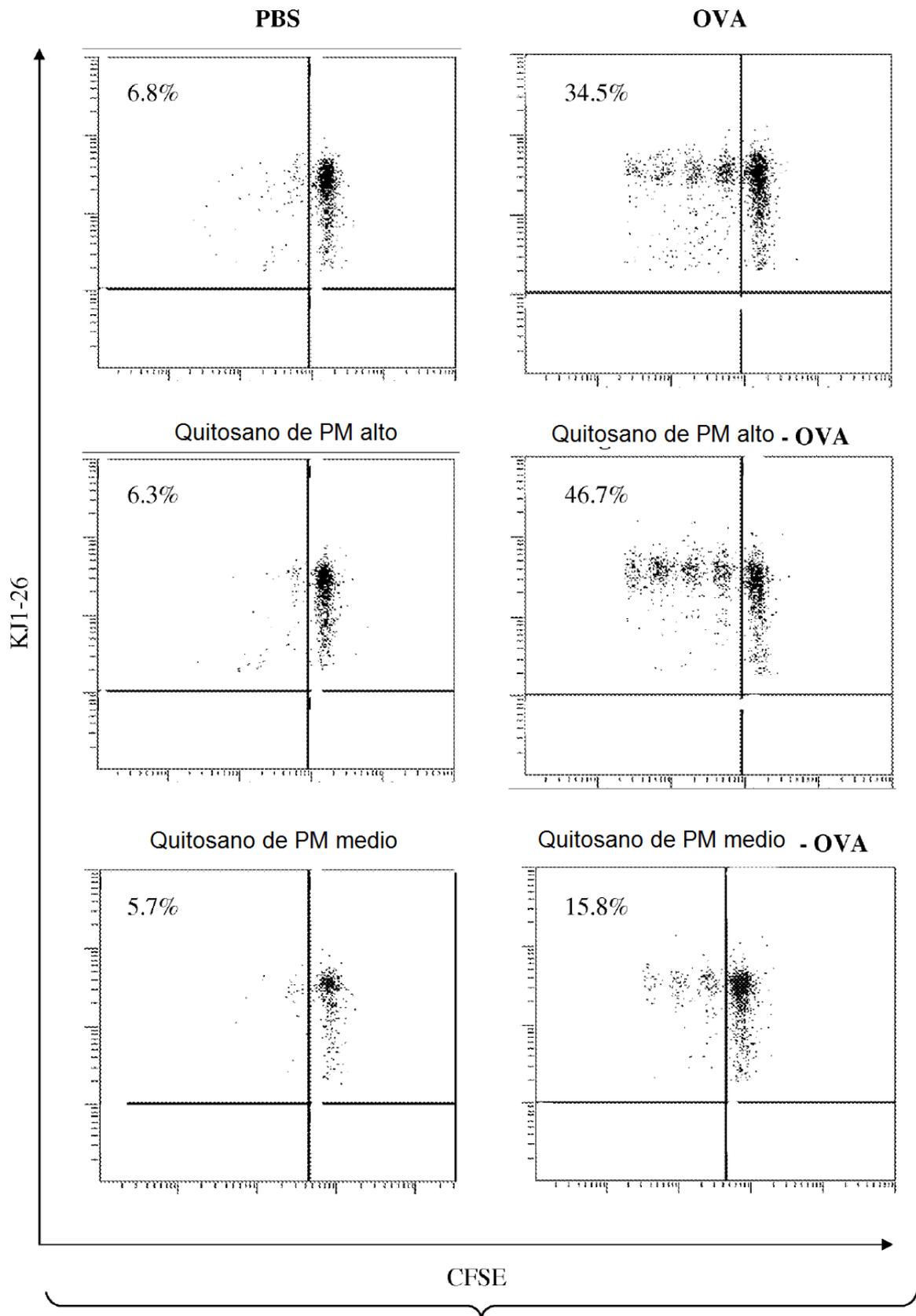


Figura 11

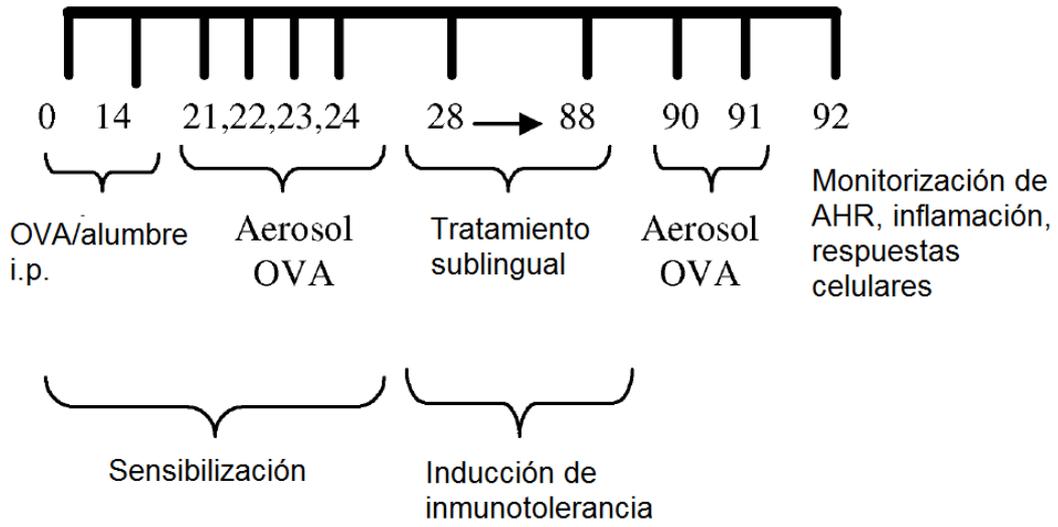


Figura 12

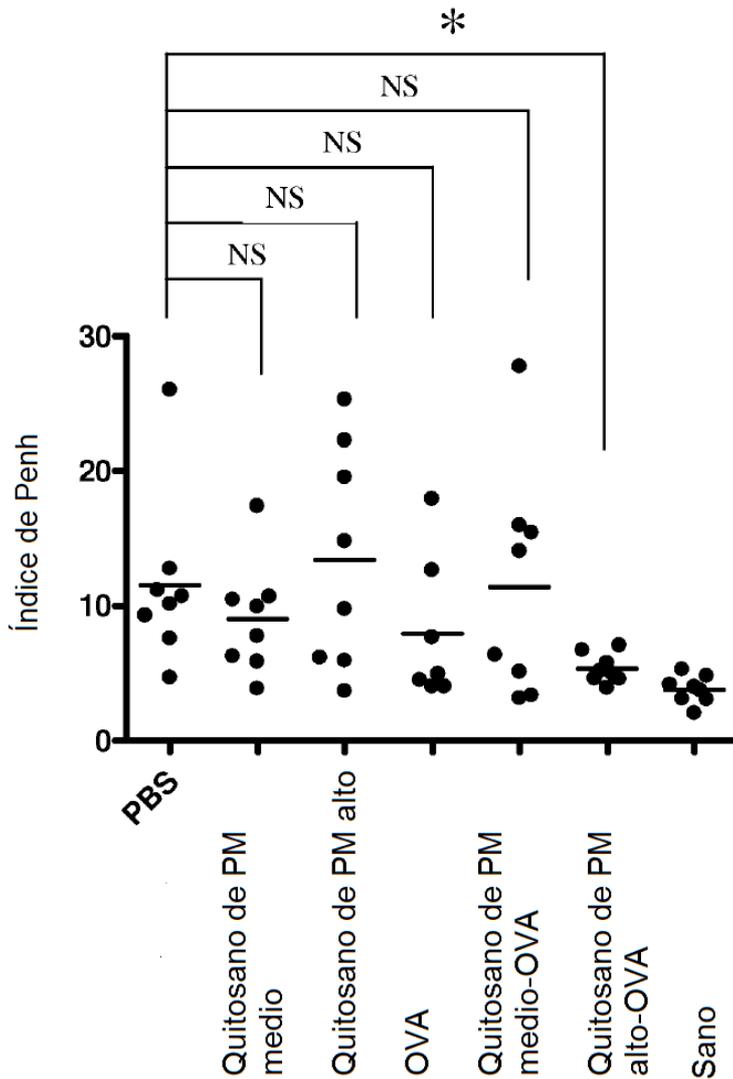


Figura 13

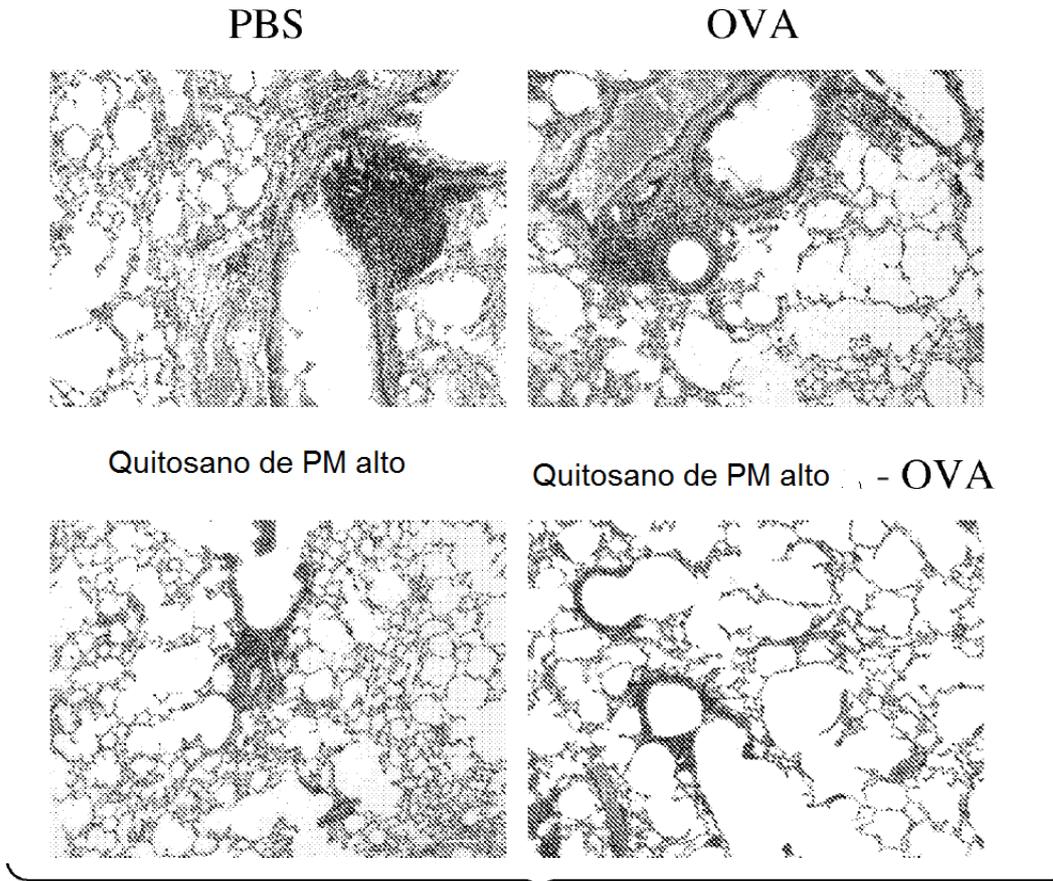


Figura 14

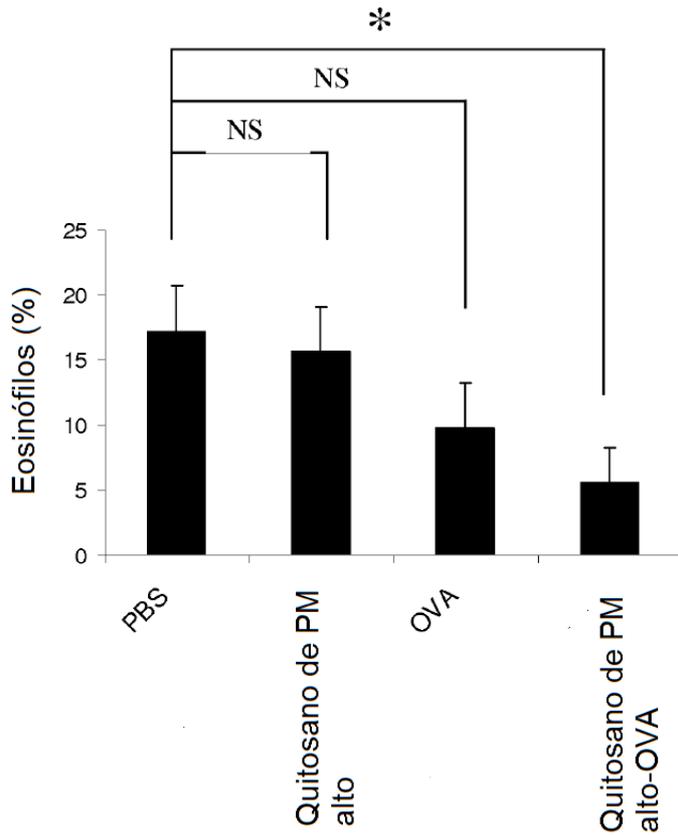
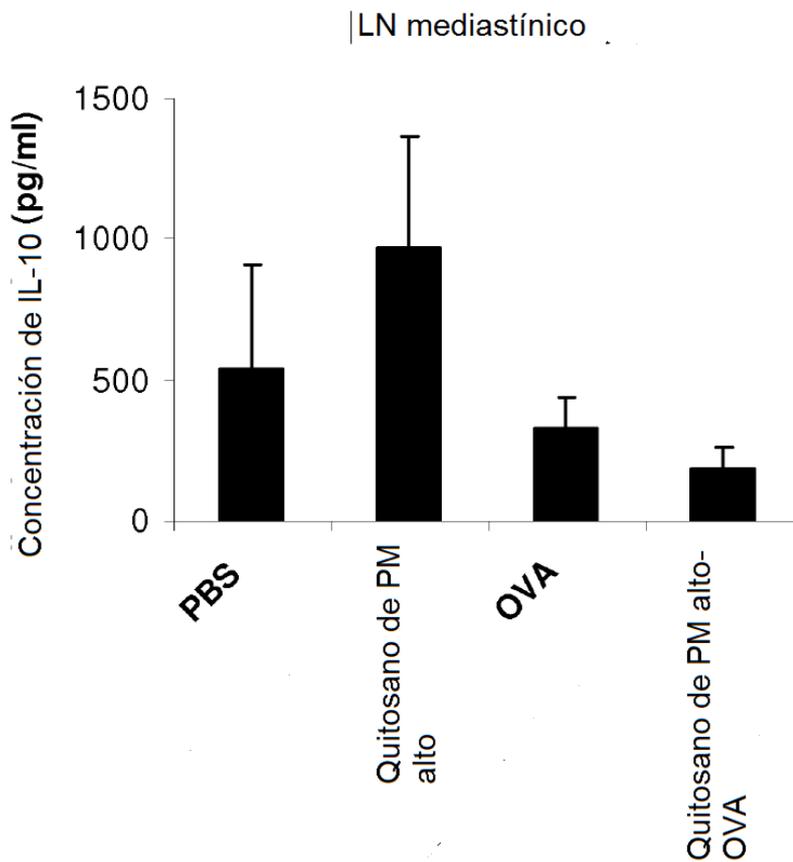
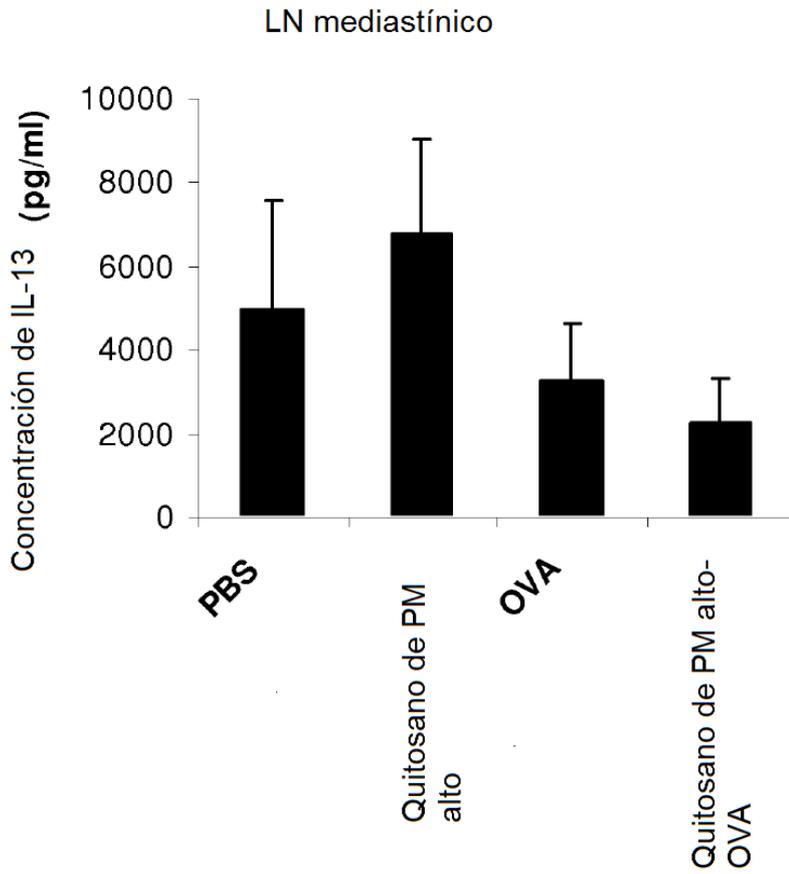


Figura 15



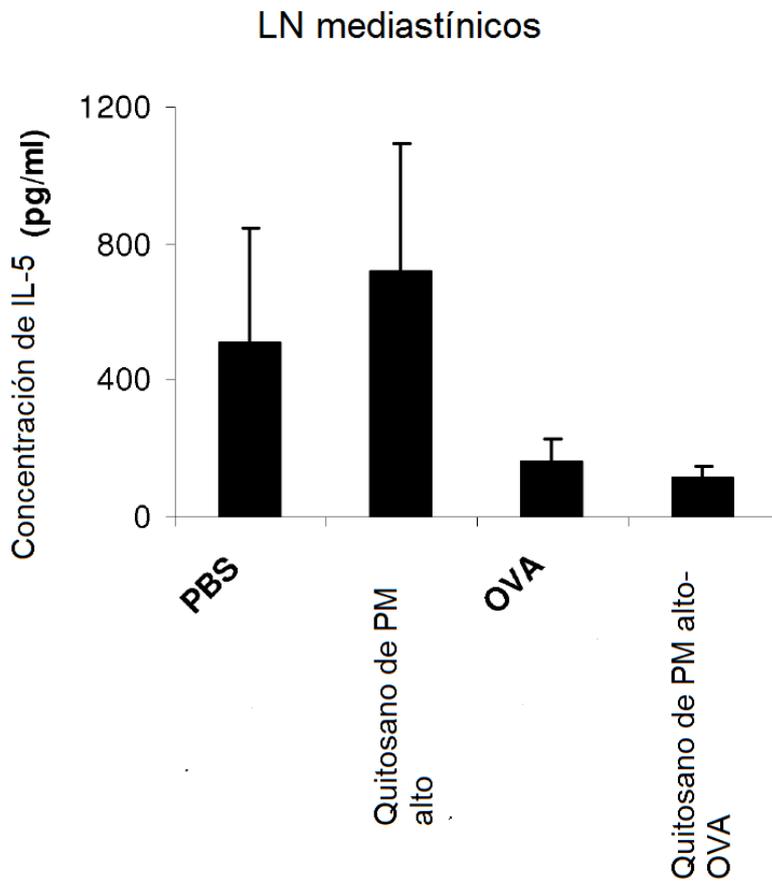


Figura 18

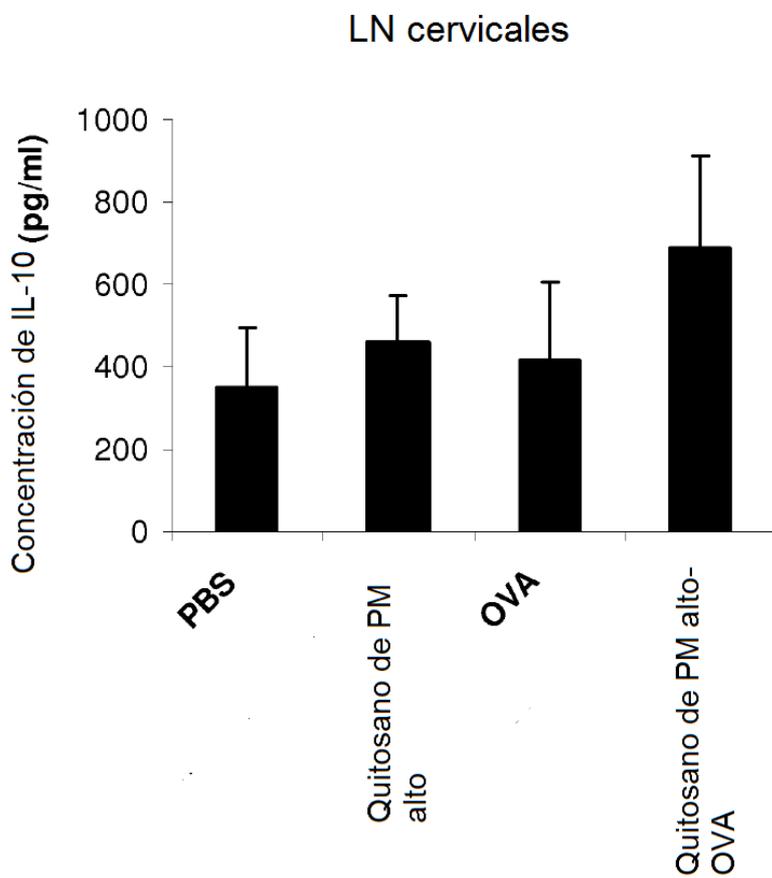


Figura 19