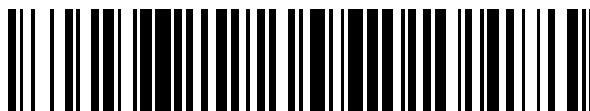


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 849**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2006 PCT/IB2006/001310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.11.2006 WO06123230**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2006 E 06755894 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 1881846**

54 Título: **Composiciones para la inducción específica de antígeno de inmunotolerancia mediante inmunización oral**

30 Prioridad:

18.05.2005 EP 05291073

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

19.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MOINGEON, PHILIPPE;
VAN OVERTVELT, LAURENCE y
RAZAFINDRATSITA, ALAIN**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 731 849 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

Composiciones para la inducción específica de antígeno de inmunotolerancia mediante inmunización oral

5 **[0001]** La presente invención se refiere a adyuvantes para inmunoterapia sublingual.

[0002] La vía sublingual ha sido recientemente explorada para la administración de antígenos en una variedad de condiciones, especialmente en el campo de la inmunoterapia de alergia. La inmunoterapia sublingual específica para alérgenos (SLIT, por sus siglas en inglés) representa una alternativa segura y eficiente no invasiva a la
10 inmunoterapia subcutánea (véase, por ejemplo, Bahceciler y col., (2005) Int. Arch. Allergy Immunol., 136:287-294). Durante la SLIT, el alérgeno es capturado dentro de la mucosa oral por células dendríticas similares a las de Langerhans que expresan receptores de IgE de alta afinidad, que producen IL10 (interleuquina 10) y TGFβ y que regulan la indoleamina dioxigenasa (IDO), lo que sugiere que estas células son propensas a inducir tolerancia.

15 **[0003]** En este contexto, existe la necesidad de adyuvantes que mejoren la respuesta inmune del huésped a una administración sublingual de antígenos y ayuden a establecer mecanismos de tolerancia activa mediada por células T.

[0004] Los agentes inmunoestimulantes o adyuvantes se han utilizado durante muchos años para mejorar las
20 respuestas inmunes del huésped a, por ejemplo, vacunas.

[0005] Una amplia gama de adyuvantes puede provocar respuestas inmunes potentes a los antígenos, pero no están privados de efectos tóxicos. Estos incluyen saponinas que forman complejos con antígenos de proteínas de membrana (complejos inmunoestimulantes), polímeros plurónicos con aceite mineral, micobacterias muertas en aceite
25 mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos como el muramil dipéptido (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípidos A y liposomas.

[0006] Se han propuesto varios adyuvantes más seguros. Por ejemplo, *Lactobacillus plantarum* se probó para el suministro intranasal de antígenos heterólogos (Grangette y col., (2001) Infection and Immunity 69(3) 1547-1553).
30

[0007] Todos estos adyuvantes se han utilizado con el objetivo de desencadenar mecanismos efectores inmunes mediados por las células T (llamadas respuestas Th1 y/o Th2).

[0008] Adel-Patient y col. (2005, Clinical and Experimental Allergy 35(4) 539-546) enseña la administración de
35 *Lactococcus lactis* recombinante que expresa β-lactoglobulina bovina a ratones por alimentación por sonda gástrica. Sin embargo, este documento no especifica en qué forma se administra exactamente la *L. lactis* recombinante.

[0009] Britti y col. (2003, Rivista di Scienza dell'Alimentazione, 32(4) 329-337) describe la administración oral de *Lactobacillus casei* o de *Bifidobacterium animalis* a ratas, opcionalmente seguida de una administración oral de ovoalbúmina para inducir tolerancia. Sin embargo, este documento no informa sobre una disminución en la respuesta
40 inmune como consecuencia de este procedimiento

[0010] Adorini y col. (2003, Journal of Cellular Biochemistry 88(2) 227-233) enseña que la administración de 1,25-dihidroxivitamina D3 puede inducir tolerancia a los aloinjertos de islotes de ratón totalmente desajustados. Sin
45 embargo, no se administra antígeno con 1,25-dihidroxivitamina D3, y no se describe ninguna tolerancia específica al antígeno.

[0011] Los inventores ahora han identificado adyuvantes que producen células T reguladoras específicas de antígeno cuando se administran por vía sublingual, perlingual u oral.
50

[0012] Estos mecanismos reguladores mediados por células T inhiben los mecanismos efectores Th1 y Th2 mencionados anteriormente, en particular al provocar un aumento en la secreción de IL10 por las células T.

[0013] Tales adyuvantes son de gran interés en la inmunoterapia de trastornos alérgicos y otros trastornos
55 inmunes.

[0014] Aunque se sabe que tanto la anergia como el agotamiento de las células T contribuyen al establecimiento de la tolerancia periférica contra los antígenos propios y no propios o los alérgenos ambientales, ahora se admite ampliamente que las poblaciones de células T específicas de antígenos con función supresora/reguladora
60 desempeñan una tarea fundamental en controlar las respuestas inmunes a los antígenos propios y no propios. Estas células, denominadas células T reguladoras, son heterogéneas e incluyen: (i) células CD4 + CD25 + T que se producen naturalmente (ii) células inducidas en la periferia después de la exposición al antígeno (por ejemplo, células Tr1, células Th3 y células Tr CD8+).

65 **[0015]** Los adyuvantes identificados por los inventores son una bacteria seleccionada de *Bifidobacterium* y una

bacteria del ácido láctico, y una combinación de un corticosteroide y vitamina D3 (o sus metabolitos, como 1 α ,25-dihidroxitamina D3 o análogos).

5 **[0016]** Los inventores han demostrado notablemente que estos adyuvantes podían inducir la secreción de IL10 por las células T *in vitro* y que podían mejorar la eficacia clínica de la inmunoterapia específica en un modelo animal de asma.

[0017] Aquí se describe así una composición inmunogénica para inducir tolerancia específica al antígeno para administración sublingual, perlingual u oral, que comprende al menos un antígeno y al menos un adyuvante que es:

10

- una bacteria del ácido láctico, y/o

- una combinación de un corticosteroide con vitamina D3 o cualquier metabolito o análogo de este último,

15 **[0018]** en un vehículo farmacéuticamente aceptable que sea adecuado para administración sublingual, perlingual u oral. La vía de administración preferida es la vía perlingual.

[0019] Un objetivo de la invención es, por lo tanto, una composición inmunogénica para uso en un procedimiento de tratamiento, en el que el tratamiento se logra mediante la inducción de tolerancia específica al antígeno mediante administración sublingual, en el que la composición comprende al menos un antígeno y al menos un adyuvante que es:

20

- una bacteria que es *Lactobacillus plantarum*; o

25 - una combinación de un corticosteroide con vitamina D3, o cualquier metabolito o análogo de este último seleccionado de la lista que consiste en 1 α ,25-dihidroxitamina D3 y cualquiera de colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-26,27-hexafluorocolecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-22-en-26,27-hexafluorocolecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-26,27-hexafluoro-16-en-23-in-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-23-in-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-16-en-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol, 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-colecalciferol, 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol, 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol, o 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol;

30

en un vehículo farmacéuticamente aceptable que sea adecuado para la administración sublingual.

35 **[0020]** La invención también se refiere al uso de un adyuvante que es una bacteria que es *Lactobacillus plantarum*; o una combinación de un corticosteroide con vitamina D3, o cualquier metabolito o análogo de este último seleccionado de la lista que consiste en 1 α ,25-dihidroxitamina D3 y cualquiera de colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-26,27-hexafluorocolecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-22-en-26,27-hexafluorocolecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-26,27-hexafluoro-16-en-23-in-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-23-in-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-16-en-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol, 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-colecalciferol, 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol, 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol, o 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol; en asociación con al menos un antígeno, para la preparación de una composición inmunogénica para la inducción de una tolerancia específica al antígeno mediante administración sublingual.

40

45

[0021] Estos adyuvantes son útiles para la preparación de una composición inmunogénica para administración sublingual en asociación con al menos un antígeno, para inducir una tolerancia específica al antígeno, especialmente para provocar o mejorar las respuestas de células T reguladoras específicas de antígeno, en particular al provocar un aumento de la secreción de IL10 por los linfocitos T.

50

[0022] La composición inmunogénica que comprende un antígeno y dicho adyuvante es particularmente útil para la preparación de un medicamento para tratar una alergia, una enfermedad autoinmune o para prevenir el rechazo del injerto mediante la administración sublingual.

55 **El adyuvante**

[0023] Como se describe en el presente documento, el adyuvante puede ser una bacteria seleccionada entre una bacteria *Bifidobacterium* y una del ácido láctico.

60 **[0024]** Preferentemente, la bacteria seleccionada entre una bacteria *Bifidobacterium* y una del ácido láctico es un probiótico.

[0025] El término «probiótico» se refiere a bacterias que ejercen un efecto beneficioso sobre un hospedador al que están destinadas a ser administradas, al mejorar el equilibrio de la flora intestinal de dicho huésped.

65

[0026] Las bifidobacterias incluyen aquellas que pertenecen al género *Bifidobacterium*, tales como *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium animalis*.

[0027] Las bacterias del ácido láctico incluyen aquellas que pertenecen al género *Lactobacillus*, *Lactococcus* o *Streptococcus*, tales como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*.

[0028] El adyuvante puede ser además una mezcla de al menos dos bacterias seleccionadas entre una bacteria *Bifidobacterium* y una del ácido láctico, en particular al menos dos bacterias del ácido láctico, de distinto género o especie. También pueden ser uno o varios mutantes de los mismos, seleccionados para propiedades inmunomoduladoras específicas.

[0029] Preferentemente, la bacteria seleccionada entre una bacteria *Bifidobacterium* y una del ácido láctico, en particular la bacteria del ácido láctico, puede inducir la producción de IL10 por las células T.

[0030] Más preferentemente, la bacteria del ácido láctico es un *Lactobacillus*, lo más preferentemente *Lactobacillus plantarum*.

[0031] La bacteria seleccionada entre una *Bifidobacterium* y una bacteria del ácido láctico, en particular la bacteria del ácido láctico, puede estar presente en la composición inmunogénica de la invención en aproximadamente $1 \cdot 10^8$ a $1 \cdot 10^9$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, preferentemente de aproximadamente $1 \cdot 10^8$ a $1 \cdot 10^9$ UFC/ml.

[0032] Como se describe en este documento, el adyuvante puede ser una combinación de un corticosteroide con vitamina D3 o cualquier metabolito o análogo de este último. Preferentemente, el adyuvante es una combinación de (i) un corticosteroide y (ii) vitamina D3 o $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3.

[0033] El glucocorticoide utilizado como adyuvante puede ser de cualquier tipo. Puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en cortisona, hidrocortisona, beclometasona, flunisolida, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triquinolona, deflazacort, betametasona, dexametasona, diflorasona, fluticasona, halobetasol, budesonida, clobetasol, fluocinolona, y triamcinolona o cualquier sal farmacéuticamente aceptable de estas. Preferentemente es dexametasona o fluticasona. Lo más preferible es la dexametasona.

[0034] Como se usa en el presente documento, el término «vitamina D3» significa colecalciferol. Sus metabolitos o análogos incluyen $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 y cualquiera del colecalciferol;

$1\alpha,25$ -dihidroxi-26,27-hexafluorocolecalciferol;

$1\alpha,25$ -dihidroxi-22-en-26,27-hexafluorocolecalciferol;

$1\alpha,25$ -dihidroxi-26,27-hexafluoro-16-en-23-in-colecalciferol;

$1\alpha,25$ -dihidroxi-23-in-colecalciferol;

$1\alpha,25$ -dihidroxi-16-en-colecalciferol;

$1\alpha,25$ -dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol;

26,26,26,27,27,27-hexafluoro- 1α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-colecalciferol;

26,26,26,27,27,27-hexafluoro- 1α -25-dihidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol;

26,26,26,27,27,27-hexafluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol; y

26,26,26,27,27,27-hexafluoro- 1α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol.

[0035] Una combinación preferida es dexametasona y $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3.

[0036] La combinación de vitamina D3 o sus metabolitos o análogos, y corticosteroides, puede estar presente en las siguientes proporciones:

- vitamina D3 (o sus metabolitos o análogos)/corticosteroide: 0,001 a 0,01 %, preferentemente aproximadamente 0,003 % (p/p);

- adyuvante (vitamina D3 o sus metabolitos o análogos + corticosteroide)/antígeno: 1 a 10 %, preferentemente

aproximadamente 4 % (p/p);

- adyuvante (vitamina D3 o sus metabolitos o análogos + corticosteroides)/composición completa: 1 a 10 %, preferentemente alrededor de 3 a 5 %, preferentemente alrededor de 4 % (p/p).

5

El antígeno

[0037] El antígeno puede ser de cualquier tipo. Puede ser una proteína, un polipéptido o un péptido, un carbohidrato, un lípido o un ácido nucleico.

10

[0038] Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos definidas y que comprenden epítomos de células T, pueden identificarse para cualquier autoantígeno o antígeno proteico. Un procedimiento incluye dividir el antígeno proteico en péptidos no superpuestos o superpuestos de longitudes deseadas y sintetizar, purificar y probar esos péptidos para determinar si los péptidos comprenden al menos un epítome de células T utilizando cualquier número de ensayos (por ejemplo, ensayos de proliferación de células T, ensayos de secreción de linfocinas y estudios de no respuesta de células T). En otro procedimiento, se utiliza un algoritmo para predecir aquellos péptidos que probablemente comprenden epítomos de células T y a continuación sintetizar, purificar y probar los péptidos pronosticados por el algoritmo en ensayos de células T para determinar si dichos péptidos predichos causan la proliferación de células T o la secreción de linfocinas, o falta de respuesta de células T y, por lo tanto, es probable que contengan epítomos de células T.

15

20

[0039] En una realización preferida, el antígeno es un alérgeno. Un «alérgeno» se define como una sustancia, generalmente una proteína, que provoca la producción de anticuerpos IgE en individuos predispuestos. Definiciones similares se presentan en las referencias siguientes: Clin. Exp. Allergy, No. 26, pp. 494-516 (1996); Mol. Biol. of Allergy and Immunology, ed. R. Bush, Immunology and Allergy Clinics of North American Series (agosto de 1996).

25

[0040] Preferentemente, el antígeno es un alérgeno proteico, lo que significa cualquier cadena de aminoácidos que pueda desencadenar una respuesta alérgica, incluidos los péptidos cortos de aproximadamente 6 a 20 aminoácidos, polipéptidos o proteínas completas.

30

[0041] Preferentemente, el alérgeno proteico se selecciona 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 *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 *Thuya*; 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*.

35

40

45

[0042] Los ejemplos de varios alérgenos proteicos conocidos derivados de algunos de los géneros identificados anteriormente incluyen: *Betula* (verrucosa) Bet v I ; Bet v II ; *Blomia* Blo t I ; Blo t III ; Blo t V ; Blo t XII ; *Cinorrodón* Cyn d I ; *Dermatophagoides* (*pteronysinus* 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 ; *Felis* (*domesticus*) Fel d I ; *Ambrosia* (*artemisiifolia*) Amb a I.1 ; Amb a I.2 ; Amb a I.3 ; Amb a I.4 ; Amb a II ; *Lolium* (*perenne*) Lol p I ; Lot p II ; Lol p III ; Lot p IV ; Lol p IX (Lol p V or Lol p Ib) ; *Cryptomeria* (*japonica*) Cry j I ; Cry j II ; *Can f* I ; Can f II ; *Juniperus* (*sabinoide*s 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.

50

55

[0043] Además, las enfermedades autoinmunes similares a la alergia, como la diabetes tipo I, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide son generalmente aceptadas como 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 al propio tejido del cuerpo. Lo mismo se aplica al fenómeno del rechazo del injerto, donde el antígeno pertenece al tejido del injerto, posiblemente proveniente de otro individuo o incluso de otra especie animal.

60

[0044] En otra realización, el antígeno está implicado en una enfermedad autoinmune o rechazo de injerto.

[0045] Se ha hallado que varios antígenos (es decir, autoantígenos) causan síntomas en enfermedades autoinmunes (es decir, autoantígenos tales como la insulina; proteína básica de mielina; factor rh; receptores de

65

acetilcolina; receptores de células tiroideas; proteínas de la membrana basal; proteínas tiroideas; ICA-69 (PM-1); ácido glutámico decarboxilasa (64K o 65 K); proteína proteolípida (PLP), glicoproteína asociada a la mielina (MAG), colágeno (tipo II), proteína de choque térmico y carboxipeptidasa H, como diabetes, artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

5 *Composiciones inmunogénicas*

[0046] El antígeno y el adyuvante como se definieron anteriormente se combinan en una composición inmunogénica o se presentan por separado para una administración conjunta.

10 **[0047]** Uno puede emplear uno o varios antígenos. La composición inmunogénica comprende al menos un adyuvante como se definió anteriormente, es decir, que también se pueden emplear adyuvantes adicionales.

[0048] El antígeno y el adyuvante están asociados con un vehículo farmacéuticamente aceptable que es adecuado para la administración sublingual. El antígeno y el adyuvante también pueden coadministrarse en forma de
15 composiciones separadas. La administración conjunta significa la administración simultánea o consecutiva de dichas composiciones.

[0049] Como se usa en este documento, el término «portador farmacéuticamente aceptable» incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, excipientes
20 mucoadhesivos y similares, que no producen una reacción adversa o indeseable cuando se administran a un animal, o humano, según corresponda.

[0050] Las formas de dosificación sublingual preferidas incluyen formas sólidas, comprimidos adhesivos, biopelículas o cremas, pomadas, polvos, geles y pastas. Una forma preferida es un comprimido, por ejemplo, como el
25 descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.244.663. La unidad de dosificación sublingual se fabrica para desintegrarse rápidamente. El período de tiempo para la desintegración completa de la unidad de dosificación está típicamente en el intervalo de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 30 minutos, y de manera óptima es inferior a 5 minutos.

30 **[0051]** Los excipientes pueden incluir además, pero no están limitados a desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, saborizantes, colorantes, conservantes. Los desintegrantes adecuados incluyen almidón seco, carbonato de calcio, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán, laurilsulfato de sodio, monoglicérido esteárico, lactosa, así como polivinilpirrolidonas reticuladas, como la crospovidona (por ejemplo, Polyplasdone™ XL, que puede obtenerse de GAF), metilcelulosas carboxílicas reticuladas, como la croscarmelosa (por ejemplo, Ac-di-sol™, que puede
35 obtenerse de FMC), ácido alginico y almidones de carboximetilo de sodio (por ejemplo, Explotab™, que puede obtenerse de Edward Medell Co., Inc.), metilcelulosa, agar bentonita y ácido alginico. Los aglutinantes, si se utilizan, son aquellos que mejoran la adherencia. Los ejemplos de tales aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, almidón, gelatina y azúcares tales como sacarosa, dextrosa, melaza y lactosa. Los lubricantes preferidos son estearatos y ácido esteárico.

40 **[0052]** La lactosa, manitol y croscarmelosa son excipientes preferidos.

[0053] Los componentes adicionales que pueden incorporarse en las formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, ver Remington: The Science and Practice of
45 Pharmacy, 19th edition (Mack Publishing, 1995).

[0054] En otra realización, la composición inmunogénica está en forma líquida.

[0055] La composición se puede administrar como partículas de polvo seco o como una solución acuosa
50 atomizada suspendida en un gas portador (por ejemplo, aire o N₂). Las formulaciones en aerosol preferidas pueden comprender, por ejemplo, una solución salina tamponada fisiológicamente aceptable que contiene entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 300 mg de los antígenos.

[0056] Para la preparación de suspensiones acuosas y/o elixires, se pueden emplear diversos agentes
55 edulcorantes o aromatizantes, colorantes y, si se desea, agentes emulsionantes y/o suspensores, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y distintas combinaciones de los mismos. Se prefiere la glicerina.

[0057] La composición inmunogénica se administra preferentemente al paciente debajo de la lengua. La
60 mucosa sublingual, ubicada en la parte inferior de la lengua, facilita la captura del antígeno y el adyuvante por células similares a las de Langerhans que migran a los ganglios linfáticos drenantes para cebar los linfocitos T.

[0058] Por ejemplo, el alérgeno de la proteína Bet v I recombinante se ha formulado como un comprimido para la administración sublingual.

65 **[0059]** Cuando está en forma líquida, la composición se puede administrar debajo de la lengua colocando una

o más gotas debajo de la lengua o rociando la parte inferior de la lengua con un volumen preseleccionado de la composición líquida. Preferentemente, el volumen administrado, ya sea en gotas o en spray, es inferior a aproximadamente 1 ml.

5 **[0060]** Una vía de administración de particular interés es mantener la composición debajo de la lengua unos minutos, por ejemplo, unos 2 minutos, antes de tragarla.

[0061] Cuando el antígeno y el adyuvante se administran conjuntamente en composiciones separadas, pueden estar en distintos tipos de vehículos, ambos adecuados para la administración sublingual o coadministrada. Por
10 ejemplo, el antígeno puede estar en forma de una composición sólida, mientras que el adyuvante está en una composición líquida.

Inmunoterapia

15 **[0062]** La asociación de un antígeno con el adyuvante como se definió anteriormente provoca o mejora las respuestas de las células T reguladoras específicas de antígeno.

[0063] Las composiciones inmunogénicas que combinan un antígeno con el adyuvante se pueden utilizar como una vacuna, o en un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico para la prevención o el retraso en la aparición
20 de los síntomas de la enfermedad causada por un antígeno ofensivo o provoca una reducción, progresión, o alivio de los síntomas causados por un antígeno casual, es decir, descenso de una respuesta inmune específica de antígeno.

[0064] La inmunoterapia de alergias generalmente comprende desensibilización o hiposensibilización, que es un tratamiento que consiste en administrar al paciente dosis cada vez mayores del alérgeno(s) al que el paciente ha
25 desarrollado o es probable que desarrolle una sensibilidad.

[0065] Se describe adicionalmente un procedimiento para prevenir o tratar una alergia, procedimiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un antígeno y el adyuvante como se describe anteriormente, por
ejemplo, en forma de una composición inmunogénica, en la que el antígeno es un alérgeno.

30 **[0066]** Se describe adicionalmente un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmune, procedimiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un antígeno y el adyuvante como se describió anteriormente, por ejemplo, en forma de una composición inmunogénica, en la que el antígeno está implicado en la enfermedad autoinmune. Los ejemplos no limitantes incluyen artritis reumatoide, esclerosis múltiple, oftalmopatía endocrina,
35 uveorretinitis, diabetes tipo 1, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, miastenia gravis, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, enfermedad hepática autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal autoinmune y enfermedad de Crohn.

[0067] El antígeno y el adyuvante como se describió anteriormente, por ejemplo, en forma de una composición
40 inmunogénica, también son útiles en el tratamiento de receptores de trasplantes de tejidos u órganos para reducir el rechazo de aloinjertos inducido por el hospedador.

[0068] Se describe además un procedimiento para prevenir un rechazo de injerto, procedimiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un antígeno y el adyuvante como se describe anteriormente, por
45 ejemplo, en forma de una composición inmunogénica, en la que el antígeno pertenece al tejido del injerto y es probable que provoque el rechazo del injerto.

[0069] El sujeto es preferentemente un ser humano, independientemente de su edad, sexo y condición. También puede ser cualquier otro mamífero, incluidas mascotas como gatos o perros.

50 **[0070]** El ejemplo y las figuras a continuación ilustran la invención sin limitar su alcance.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS:

55 **[0071]**
Figura 1: Diseño experimental

A. La sensibilización se realizó mediante dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) en un intervalo de 14 días con 10 µg de ovoalbúmina (OVA) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) (control) adsorbida en 2 mg de Al(OH)₃. La
60 sensibilización fue seguida por una prueba de aerosol de 20 minutos con 1 % m/v de OVA en 5 días consecutivos. Se tomaron muestras de sangre (sangrado) después de la sensibilización para realizar la titulación del anticuerpo anti-OVA. Las mediciones de la capacidad de respuesta de las vías respiratorias se realizaron mediante pletismografía de cuerpo entero. Después del sacrificio de los ratones, se aislaron células de bazo y pulmón para el análisis de citoquinas y la detección de inflamación, respectivamente.

65

Para la inducción de tolerancia en un modelo terapéutico, los ratones sensibilizados se trataron por vía sublingual con PBS (control), OVA u OVA más adyuvante cada semana, dos veces a la semana, durante 2 meses a una concentración de 500 µg. Se tomaron muestras de sangre (sangrado) para el análisis de la respuesta humoral. Las mediciones de la capacidad de respuesta de las vías respiratorias se realizaron mediante pletismografía de cuerpo entero. Después del sacrificio de los ratones, se extirparon el bazo y el pulmón para realizar ensayos de citoquinas *in vitro* y análisis de inflamación, respectivamente.

B. Para la inducción de tolerancia en un modelo profiláctico, los ratones se trataron por vía sublingual con PBS, OVA u OVA más adyuvante cada semana, dos veces por semana, durante 1 mes a una concentración de 500 µg. La sensibilización se realizó mediante dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) en un intervalo de 14 días con 10 µg de ovoalbúmina (OVA) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) (control) adsorbida en 2 mg de Al(OH)₃. La sensibilización fue seguida por una prueba de aerosol de 20 minutos con 1 % m/v de OVA en 5 días consecutivos. Se tomaron muestras de sangre (sangrado) para el análisis de la respuesta humoral. Las mediciones de la capacidad de respuesta de las vías respiratorias se realizaron mediante pletismografía de cuerpo entero. Después del sacrificio de los ratones, se extirparon el bazo y el pulmón para realizar ensayos de citoquinas *in vitro* y análisis de inflamación, respectivamente.

Figura 2: Respuestas humorales, celulares, respiratorias e inflamación después de la sensibilización.

A. Los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a (dilución 1/100) específicos de OVA se midieron en sueros de 4 ratones sensibilizados con OVA.

B. Se midió el nivel de anticuerpos IgE (dilución 1/10) específicos de OVA en sueros de 3 ratones sensibilizados con OVA.

Los niveles de IFN-γ, IL-5 e IL10 en células de bazo de ratones sensibilizados con OVA se midieron mediante Elispot.

D. La sensibilidad de las vías respiratorias se determinó para ratones sensibilizados con PBS u OVA mediante la medición del índice de Penh en respuesta a la metacolina (50 mg/ml). Se mostraron ocho ratones por grupo (▲ = media).

E. Secciones pulmonares representativas obtenidas 48 h después de la última prueba. Las secciones de tejido de parafina se tiñeron con HES (hematoxilina, eosina, safran). Una flecha (arriba) indica la secreción de moco bronquial y la otra flecha (abajo) indica una infiltración celular específica.

Figura 3 : Respuesta de las vías respiratorias después de la inducción de tolerancia.

La sensibilidad de las vías respiratorias se determinó para ratones sanos, ratones sensibilizados con OVA y tolerados con PBS, ratones sensibilizados con OVA y tolerados con OVA y ratones sensibilizados con OVA y tolerados con OVA + dexametasona (Dex) + 1α,25-dihidroxitamina D3 (vitD3) (panel A) u OVA + *L. plantarum* (panel B) mediante la medición del valor de Penh en respuesta a la metacolina (50 mg/ml). Se mostraron de cuatro a ocho ratones por grupo (barra horizontal = mediana).

Figura 4: Producción de TGF-β después de la inducción de tolerancia.

La producción de TGF-β se determinó para el grupo 1 (OVA sensibilizado y PBS tolerado, n = 2), grupo 2 (OVA sensibilizado y OVA tolerado, n = 3) y grupo 3 (OVA sensibilizado y OVA tolerado + VitD3 + Dex n = 4 (panel A) u OVA + *L. plantarum* n = 3 (panel B) mediante Elispot.

50 EJEMPLO:

Administración sublingual de ovoalbúmina con (i) *Lactobacillus plantarum* o (ii) 1α,25-dihidroxitamina D3 + dexametasona:

55 *Resumen:*

[0072] Los adyuvantes que inducían la expresión del gen IL10 por células T humanas *in vitro* (*Lactobacillus plantarum* o 1α,25-dihidroxitamina D3 + dexametasona) se mezclaron con ovoalbúmina y se administraron por vía sublingual a ratones Balb/c sensibilizados a la ovoalbúmina. Cuando se comparan con animales tratados solo con ovoalbúmina o con animales no tratados, cada uno de esos adyuvantes podría mejorar la eficacia clínica de la vacuna (según la mejora de la función respiratoria). La mejora clínica se correlacionó con un aumento en los linfocitos T que producen TGFβ específico de ovoalbúmina en el bazo (es decir, células T con un perfil regulador, subtipo Tr1 o Th3).

Materiales y procedimientos:

65

1. Animales, medio de cultivo, reactivos y antígenos

[0073] Se adquirieron ratones BALB/c hembras de seis semanas de edad de Charles River (L'Arbresle, Francia) y se mantuvieron con una dieta sin ovoalbúmina. Cada grupo experimental consistió de dos a ocho ratones. Se aplicaron los niveles internacionales de estándares éticos para el uso de animales.

[0074] El medio de cultivo para células de bazo consistió en RPMI 1640 que contenía un 10 % de suero de ternera fetal y un 1 % de L-glutamina (todas de Invitrogen, Francia).

10 **[0075]** La ovoalbúmina (OVA, Garde V) se adquirió de Sigma Chemicals. La solución salina tamponada con fosfato (PBS) y el alumbre se adquirieron de Invitrogen (Francia) y Pierce (Rockford, Illinois), respectivamente.

2. Adyuvantes

15 **[0076]** Se utilizó una cepa de la bacteria del ácido láctico (LAB) *Lactobacillus plantarum*, para aplicaciones *in vivo* en ratones BALB/c (Microbiologics, Inc., Saint Cloud) a $2 \cdot 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en PBS estéril.

20 **[0077]** También se utilizaron $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 (1 mg/kg) y dexametasona (0,03 μ g/kg) en PBS estéril.

3. Sensibilización e inducción de tolerancia de los ratones (figura 1)

25 **[0078]** La sensibilización se realizó mediante dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) en un intervalo de 14 días con 10 μ g de OVA adsorbida a 2 mg de $Al(OH)_3$ en un volumen total de 100 μ l. La sensibilización fue seguida por una prueba de aerosol de 20 minutos con 1 % m/v de OVA en 5 días consecutivos con un sistema de administración de aerosol (Buxco Europe; Ltd, RU). Los animales de control se trataron de forma simulada con PBS estéril.

30 **[0079]** Para la inducción de tolerancia en un modelo terapéutico, los ratones sensibilizados se trataron por vía sublingual con OVA u OVA más adyuvante cada semana, dos veces por semana, durante 2 meses a una concentración de 500 μ g (20 μ l). Los ratones de control se sensibilizaron con OVA seguido de una inducción de tolerancia simulada con PBS.

35 **[0080]** Para la inducción de tolerancia en un modelo profiláctico, los ratones se trataron por vía sublingual con PBS, OVA u OVA más adyuvante cada semana, dos veces por semana, durante 1 mes a una concentración de 500 μ g. La sensibilización se realizó mediante dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) en un intervalo de 14 días con 10 μ g de ovoalbúmina (OVA) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) (control) adsorbida en 2 mg de $Al(OH)_3$. La sensibilización fue seguida por una prueba de aerosol de 20 minutos con 1 % m/v de OVA en 5 días consecutivos.

4. Determinación de la capacidad de respuesta de las vías respiratorias.

40 **[0081]** Las mediciones de la capacidad de respuesta de las vías respiratorias se realizaron mediante pletismografía de cuerpo entero (Buxco Europe; Ltd, Reino Unido), 48 h después de la última prueba de sensibilización o inducción de tolerancia. Las señales de flujo de aire se registraron en respuesta a la metacolina en aerosol (50 mg/ml), 1 minuto, cuatro veces. El valor más alto de Penh (pausa mejorada) se tuvo en cuenta para el cálculo del índice de Penh (índice de Penh = medida de Penh/Penh PBS).

5. Determinación de los niveles séricos de anticuerpos específicos de alérgenos

50 **[0082]** Las muestras de sangre se recogieron después de la sensibilización para realizar la titulación de anticuerpos anti-OVA mediante ELISA. Para la detección de anticuerpos IgG1 e IgG2a, el suero anti-ratón se incubó con OVA purificado (0,1 μ g) recubierto en placas ELISA (Nunc, Dinamarca). Se aplicaron anticuerpos IgG1 o IgG2a anti-ratón de rata biotinilada (dilución 1/100, BD Pharmingen) y se utilizaron anticuerpos anti-IgG anti-ratón de rata conjugados con estreptavidina-peroxidasa (dilución 1/400, BD Pharmingen) para la detección. Se añadió una o-fenilendiamina y un sustrato de peróxido de hidrógeno (Sigma), se detuvo la reacción y se leyó la densidad óptica (OD) mediante un lector de ELISA a 492 nm.

60 **[0083]** Para la detección de anticuerpos IgE; los anticuerpos IgE de ratón (laboratorios Bethyl) se recubrieron sobre placas Elisa. Se aplicó el anti-suero de ratón y para la detección se utilizó OVA-digoxigenina (dilución 1/20, Roche) más anti-digoxigenina de conejo conjugada con HRPO (dilución 1/1000, Roche). Se agregó un sustrato ABTS (Roche), se detuvo la reacción y se leyó la DO mediante un lector ELISA a 405 nm.

6. Dosis de TGF- β

[0084] La dosificación de TGF- β de los sobrenadantes de cultivos de células de bazo se realizó con un kit ELISA (R&D systems).

7. Cultivos de células de bazo para el análisis de citocinas mediante Elispot

[0085] Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se aislaron células de bazo y se colocaron en placas por triplicado en placas ELISPOT de fondo plano de 96 pocillos (Millipore, Massachussets) a densidades de 2×10^5 células por pocillo. Se utilizaron distintas condiciones: medio solo, OVA (100 µg/ml) y PMA (forbol miristil acetato) (50 ng/ml, Sigma)/ionomicina (500 ng/ml, Sigma) que se utilizó como control positivo. Las células formadoras de puntos (SFC) se controlaron para IFN-γ, IL-5 e IL10. Los kits de Elispot eran de R&D systems Europe.

10 8. Histología pulmonar

[0086] Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los pulmones fueron aislados e incluidos en parafina. Las secciones de parafina del micrómetro se tiñeron con HES (hematoxilina, eosina, safran).

15 9. Expresión génica por células T humanas

[0087] Las células dendríticas CD se trataron con adyuvantes experimentales durante 24 h, se lavaron y se cultivaron con células T CD4+ indiferenciadas alogénicas purificadas. Los ARNm se extrajeron entre 24 horas y 5 días más tarde y la expresión génica se evaluó mediante PCR cuantitativa con cebadores específicos para los genes evaluados. Solo se consideraron estadísticamente significativos los datos 2 veces por encima del aumento.

Resultados

A. Selección de adyuvantes inductores de IL-10 en un modelo in vitro humano

25 [0088] Para seleccionar adyuvantes inductores de IL10 se han utilizado modelos *in vitro* en humanos que consisten en cocultivos de CD tratadas humanas con células T alogénicas. En resumen, las CD humanas se trataron con adyuvantes. Después de 24 h, las CD se lavaron y se cultivaron con células T CD4+ indiferenciadas alogénicas. Después de entre 24 horas y 5 días, la expresión génica en células T humanas se evaluó mediante PCR en tiempo real.

[0089] Entre varios posibles adyuvantes evaluados, se ha demostrado que *Lactobacillus plantarum* y 1α,25-dihidroxivitamina D3 en combinación con dexametasona (Vit/Dex) inducen la expresión del gen IL10 por células T humanas *in vitro* (Tabla 1).

35

Tabla 1: Resumen de los datos de selección para adyuvantes inductores de IL10

Adyuvantes	Expresión génica por células T					
	Tbet	IFN	GATA3	Foxp3	TGF	IL10
Vit/Dex	-	-	+	+	+	+++
<i>L. plantarum</i>	-	+++	-	-	-	++
R848	-	+	-	-	-	-
LTA	-	++	-	-	-	-
Pam3CSK4	-	-	-	-	-	-
LPS pg	-	-	-	-	-	-
Imiquimod	-	-	+	-	+	-
ssPolyU	-	-	-	-	-	-

B. Experimentos de inmunoterapia

40

1. Modelos murinos de sensibilización con OVA

[0090] Ratones, inmunizados por vía i.p. con OVA absorbida en Al(OH)₃ y posteriormente expuesta a una disolución de OVA a través de aerosol, se analizaron sus respuestas humorales, celulares, respiratorias e inflamación. Se ha demostrado que el procedimiento de sensibilización induce IgG1 e IgE específicas de OVA, pero pocos anticuerpos IgG2a en suero (figuras 2A y 2B). Según la producción de anticuerpos IgE específicos de alérgenos, las células de bazo de los ratones de sensibilización con OVA mostraron un fuerte perfil Th2 en respuesta a OVA (figura 2C). Finalmente, los ratones sensibilizados con OVA presentan hiperreactividad de las vías respiratorias a la

metacolina cuando se comparan con los ratones tratados con PBS (figura 2D). Finalmente, se ha demostrado que el protocolo de sensibilización induce la infiltración celular específica del pulmón y la secreción de moco bronquial (figura 2E).

5 2. Inducción de tolerancia por vía sublingual en un modelo terapéutico de alergia tipo I

[0091] Después de haber sensibilizado a los ratones, los inventores han probado distintos protocolos de inducción de tolerancia y, en particular, la capacidad de los posibles adyuvantes para regular al alza las respuestas de las células T reguladoras específicas de antígeno y acelerar la inducción de tolerancia por vía sublingual.

10 *Lactobacillus plantarum* y 1 α ,25-dihidroxitamina D3 en combinación con dexametasona han sido probados como adyuvantes para la regulación positiva de respuestas de células T reguladoras específicas de antígeno.

[0092] El tratamiento sublingual con OVA administrado junto con *L. plantarum* (figura 3A) o 1 α ,25-dihidroxitamina D3 más dexametasona (figura 3B) (grupo 3) llevó a una reducción de la capacidad de respuesta de las vías respiratorias en comparación con los ratones tratados con PBS (grupo 1) o animales tratados solo con OVA (grupo 2).

[0093] Finalmente, la producción de TGF- β se incrementó en el sobrenadante de cultivos de células de bazo de ratones tratados con OVA y *L. plantarum* (figura 4A) o 1 α ,25-dihidroxitamina D3 más dexametasona (figura 4B) en comparación con ratones tratados con PBS o animales tratados solo con OVA.

3. Inducción de tolerancia por vía sublingual en un modelo profiláctico de alergia tipo I

[0094] La desensibilización por vía sublingual también se prueba en un modelo profiláctico murino de asma. Brevemente, a los ratones Balb/c se les administran por vía sublingual un adyuvante que se va a analizar (1 α ,25-dihidroxitamina D3 + dexametasona) en asociación con un antígeno (OVA) (500 μ g) 2 veces por semana durante 4 semanas antes de sensibilizarlo y exponerlo a OVA.

[0095] Los resultados indican que el tratamiento previo de ratones con OVA + adyuvante según la invención puede inducir una reducción de la capacidad de respuesta de las vías respiratorias después de la posterior sensibilización.

4. Modelos murinos de sensibilización con polen de abedul y ácaro del polvo doméstico

35 **[0096]** Los adyuvantes según la invención se prueban en modelos murinos de sensibilización al polen de abedul o al ácaro del polvo doméstico y también parecen prometedores para prevenir o tratar las alergias a estos alérgenos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica para uso en un procedimiento de tratamiento, en el que el tratamiento se logra mediante la inducción de tolerancia específica al antígeno mediante administración sublingual, en el que la composición comprende al menos un antígeno y al menos un adyuvante que es:

- una bacteria que es *Lactobacillus plantarum*; o

- o una combinación de un corticosteroide con vitamina D3, o cualquier metabolito o análogo de este último seleccionado de la lista que consiste en 1 α ,25-dihidroxitamina D3, 1 α ,25-dihidroxi-26,27-hexafluorocolecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-22-en-26,27-hexafluorocolecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-26,27-hexafluoro-16-en-23-in-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-23-in-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-16-en-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol, 26,26,26,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-colecalciferol, 26,26,26,27,27-hexafluoro-1 α -25-dihidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol, 26,26,26,27,27-hexafluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol, o 26,26,26,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol;

en un vehículo farmacéuticamente aceptable que sea adecuado para la administración sublingual.

2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la bacteria induce la producción de IL10 por las células T.

3. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el adyuvante es una bacteria del ácido láctico que es *Lactobacillus plantarum*.

4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la bacteria *Lactobacillus plantarum* está en aproximadamente entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^9$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

5. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el corticosteroide es dexametasona o fluticasona.

6. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el adyuvante es una combinación de (i) dexametasona y (ii) vitamina D3 o 1 α ,25-dihidroxitamina D3.

7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el antígeno es un alérgeno.

8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el antígeno es un alérgeno proteico.

9. La composición para el uso de la reivindicación 8, en la que el alérgeno proteico se selecciona 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 *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 *Juniperus*; 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 *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. La composición para el uso de la reivindicación 9, en la que el alérgeno proteico se selecciona del grupo que consiste en Bet v I; Bet v II; Blo t I; Blo t III; Blo t V; Blo t XII; Cyn d I; Der p I; Der p II; Der p III; Der p VII; Der f I; Der f II; Der f III; Der f VII; Fel d I; Amb a I.1; Amb a I.2; Amb a I.3; Amb a I.4; Amb a II; Lol p I; Lot p II; Lol p III; Lot p IV; Lol p IX; Cry j I; Cry j II; Can f I; Can f II; Jun s I; Jun v I; Jun a I; Jun a II; Dac g I; Dac g V; Poa p I; Phl p I; Phl p V; Phl p VI y Sor h I.

11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el antígeno es una proteína implicada en una enfermedad autoinmune o un rechazo de injerto.

65

12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que está en forma de un comprimido.
13. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que está en forma líquida.
- 5 14. Uso de un adyuvante que es una bacteria que es *Lactobacillus plantarum*; o una combinación de un corticosteroide con vitamina D3, o cualquier metabolito o análogo de este último seleccionado de la lista que consiste en 1 α ,25-dihidroxitamina D3, 1 α ,25-dihidroxi-26,27-hexafluorocolecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-22-en-26,27-hexafluorocolecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-26,27-hexafluoro-16-en-23-in-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-23-in-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-16-en-colecalciferol, 1 α ,25-dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol, 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-colecalciferol, 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 α -25-dihidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol, 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol, o 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 α -fluoro-25-hidroxi-16-en-23-in-19-nor-colecalciferol; en asociación con al menos un antígeno, para la preparación de una composición inmunogénica para la inducción de una tolerancia específica al antígeno mediante 15 administración sublingual.
15. Uso de la reivindicación 14, en el que la composición provoca o mejora las respuestas de las células T reguladoras específicas de antígeno.
- 20 16. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, en el que la composición induce la producción de IL10 por las células T.
17. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el corticosteroide es dexametasona o fluticasona.
- 25 18. El uso de la reivindicación 17, en el que el adyuvante es una combinación de (i) dexametasona y (ii) vitamina D3 o 1 α ,25-dihidroxitamina D3.
19. Uso de la reivindicación 14, en el que se induce la tolerancia específica al antígeno mediante 30 administración por vía sublingual para tratar una alergia.
20. Uso de la reivindicación 14, en el que se induce la tolerancia específica al antígeno mediante administración por vía sublingual para tratar una enfermedad autoinmune.
- 35 21. Uso de la reivindicación 14, en el que se induce la tolerancia específica al antígeno mediante administración por vía sublingual para evitar el rechazo del injerto.
22. Una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1, en la que dicho procedimiento es un procedimiento para tratar o evitar la alergia.
- 40 23. Una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1, en la que dicho procedimiento es un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmune.
24. Una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1, en la que dicho procedimiento es un 45 procedimiento para prevenir el rechazo del injerto.

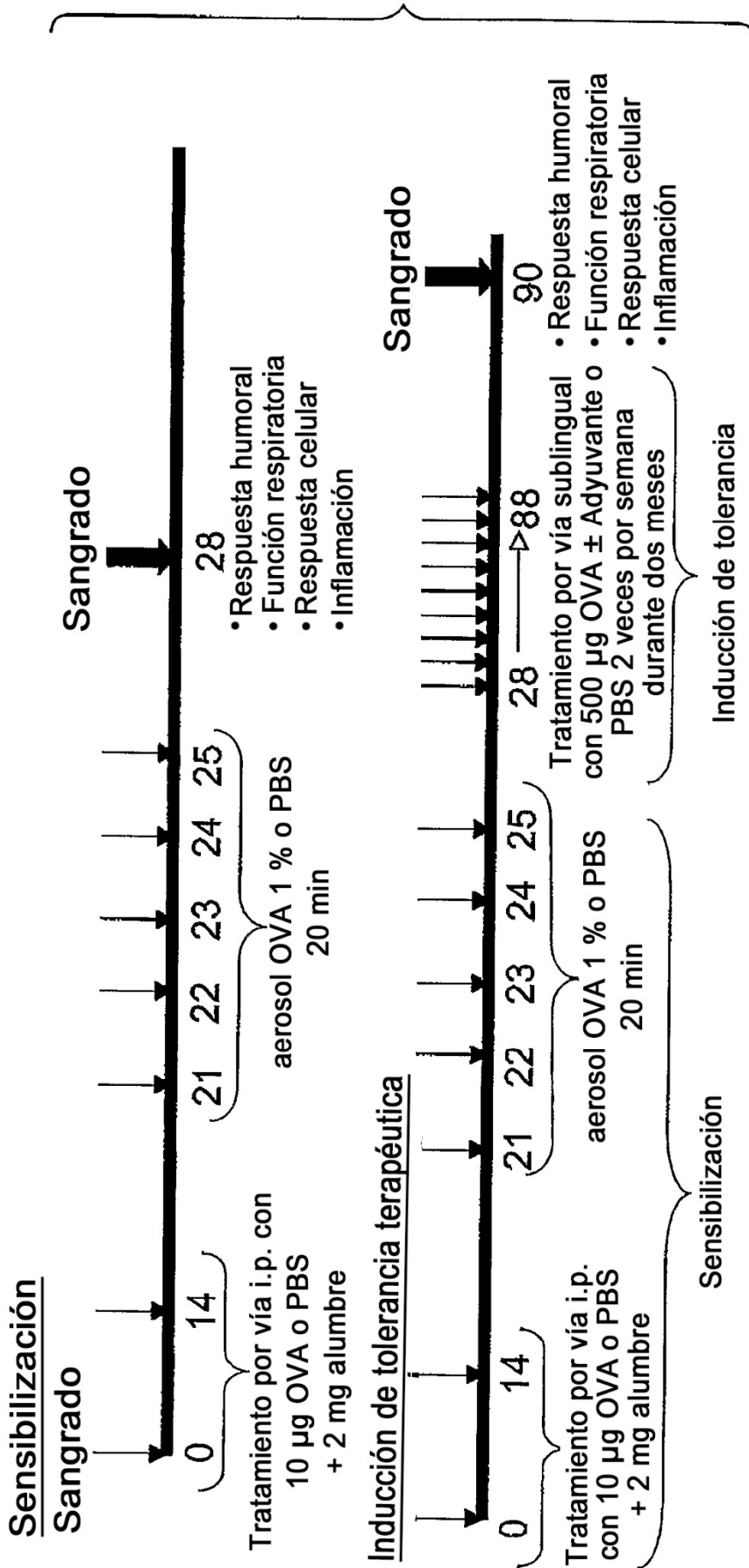


FIG.1A

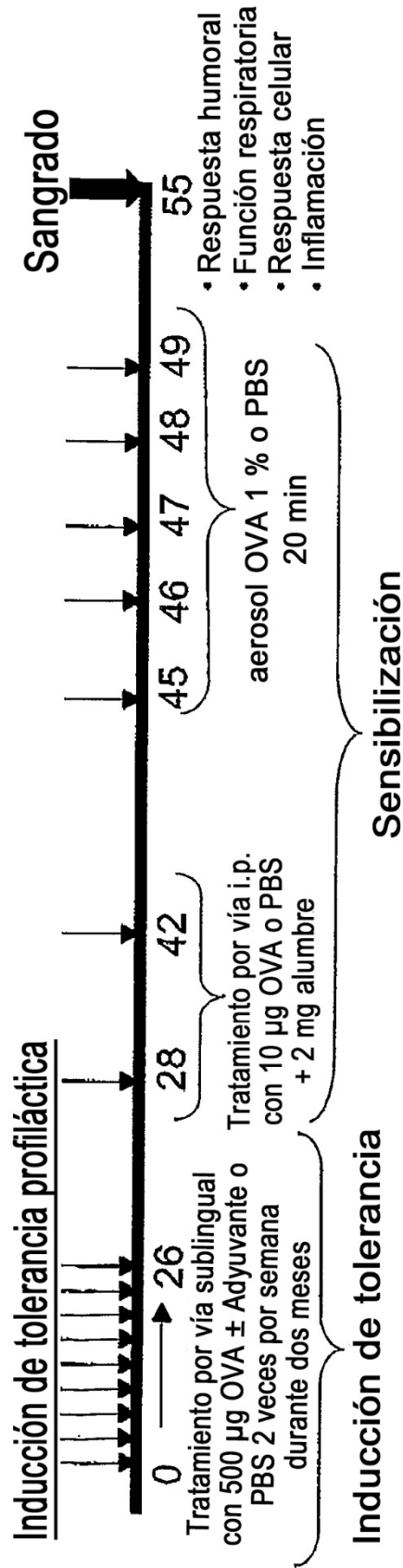


FIG.1B

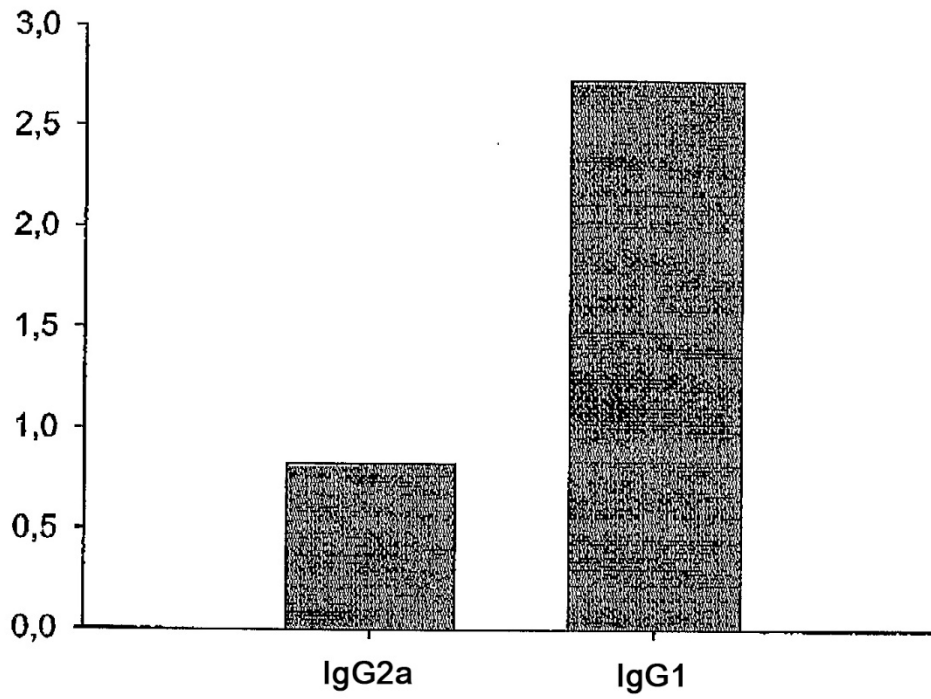


FIG.2A

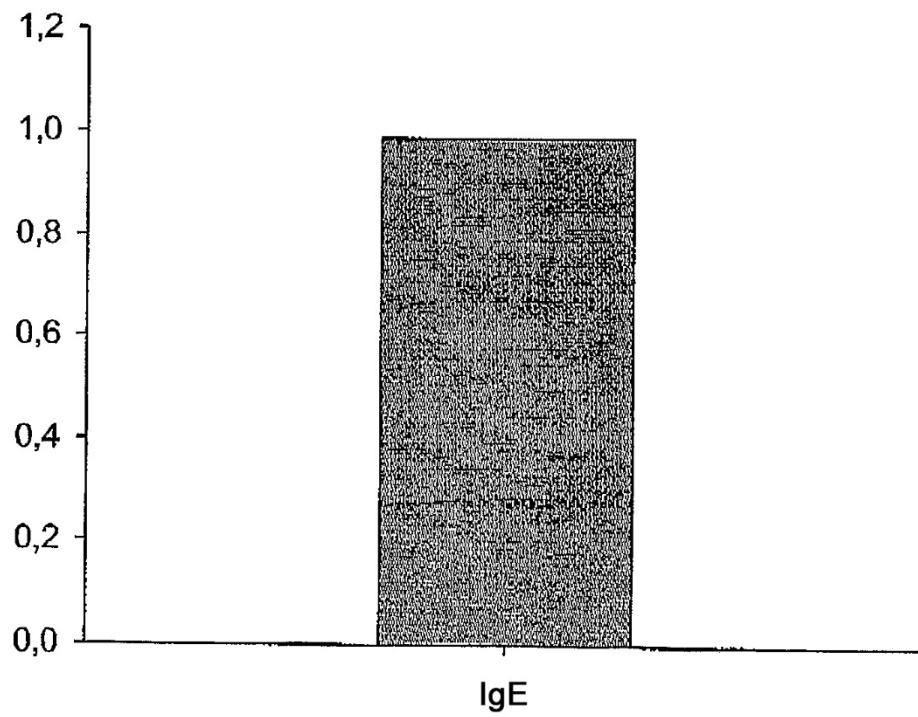


FIG.2B

IFN- γ	IL-5	IL-10
-	+++	-

FIG.2C

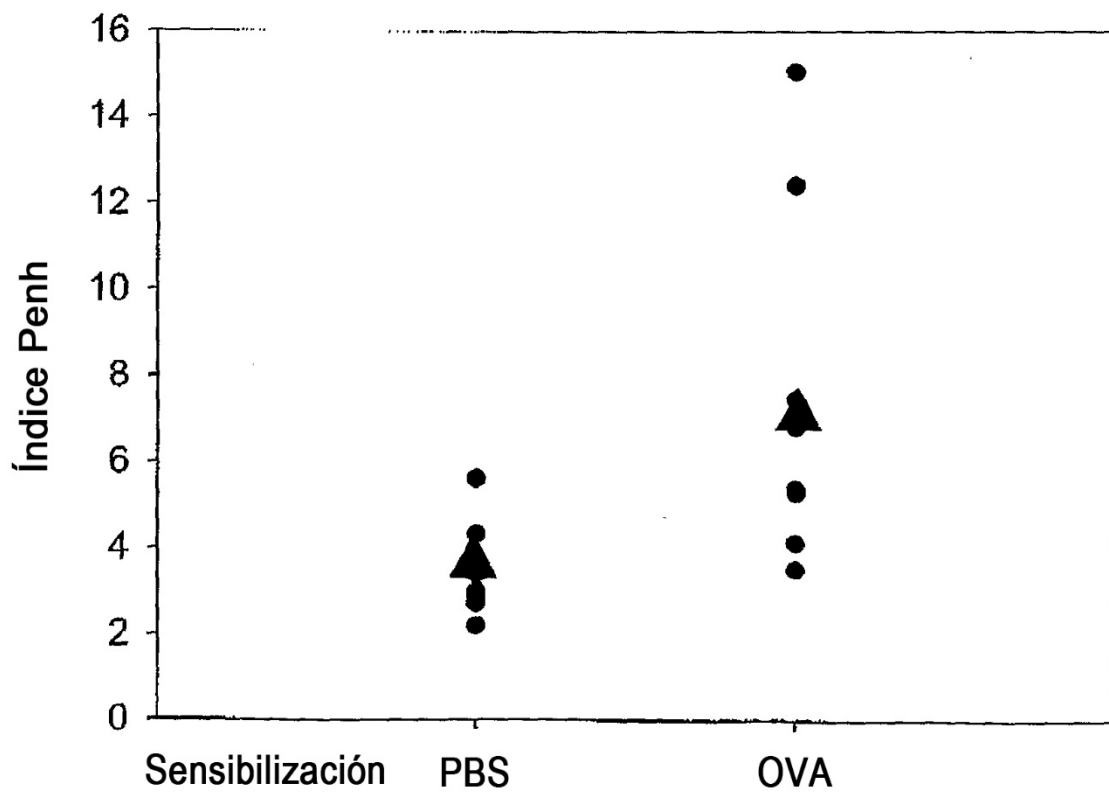


FIG.2D

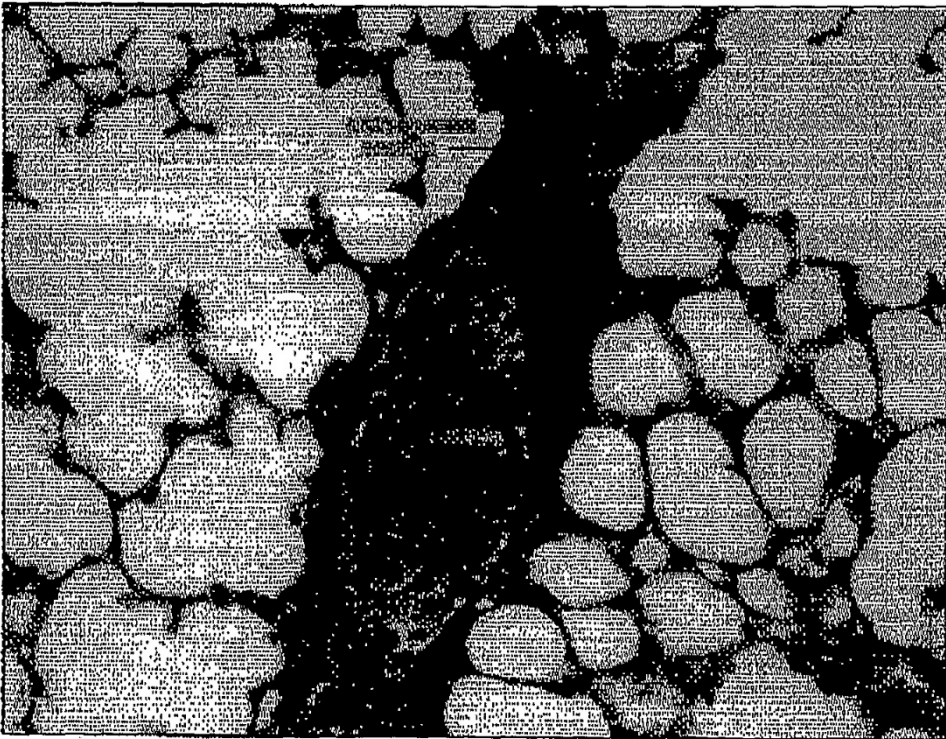


FIG.2E

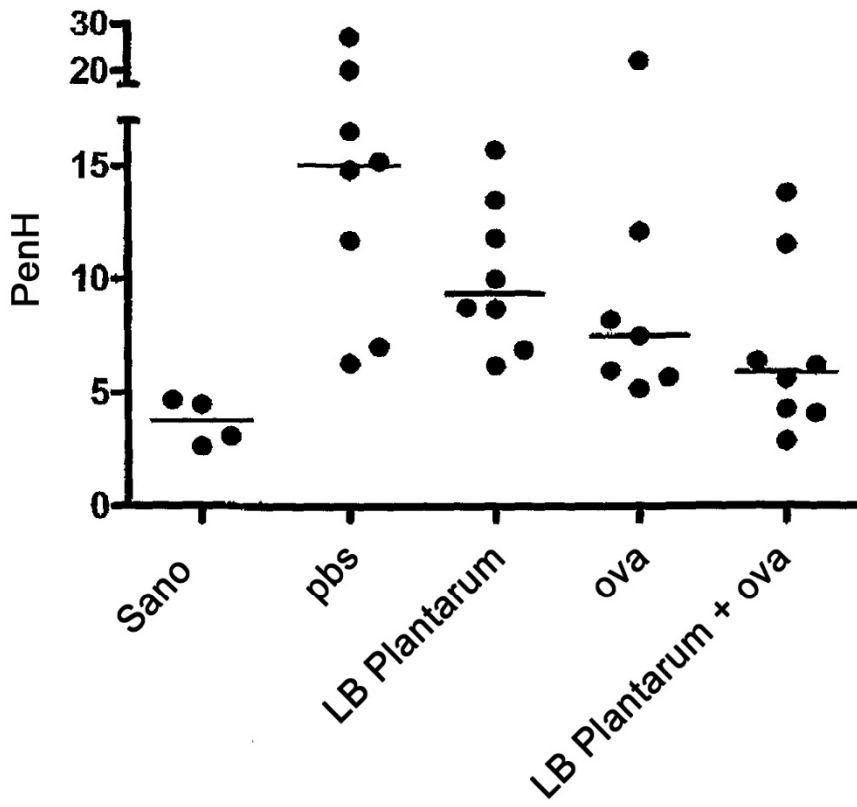


FIG.3A

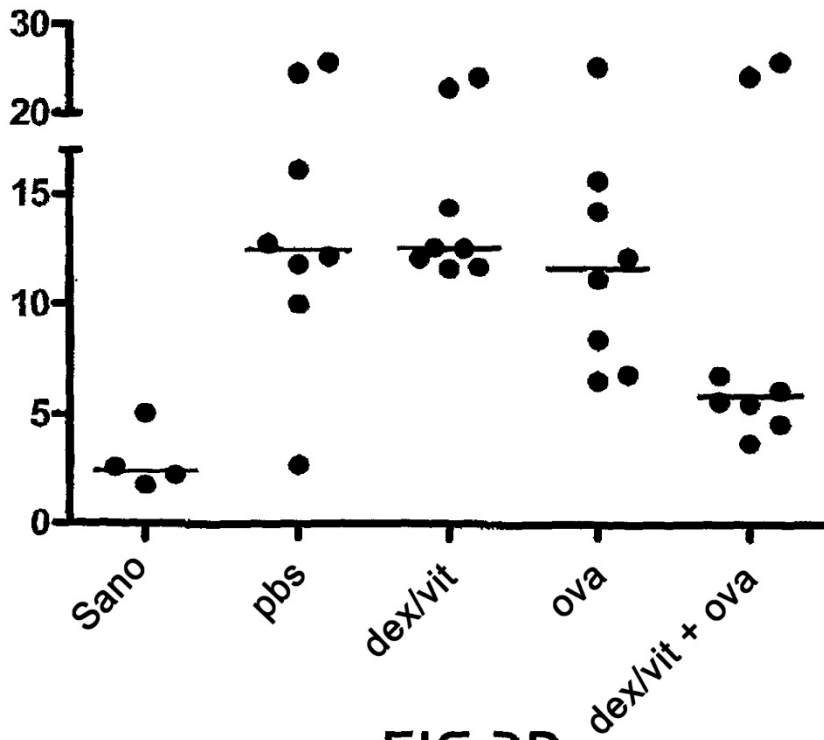


FIG.3B

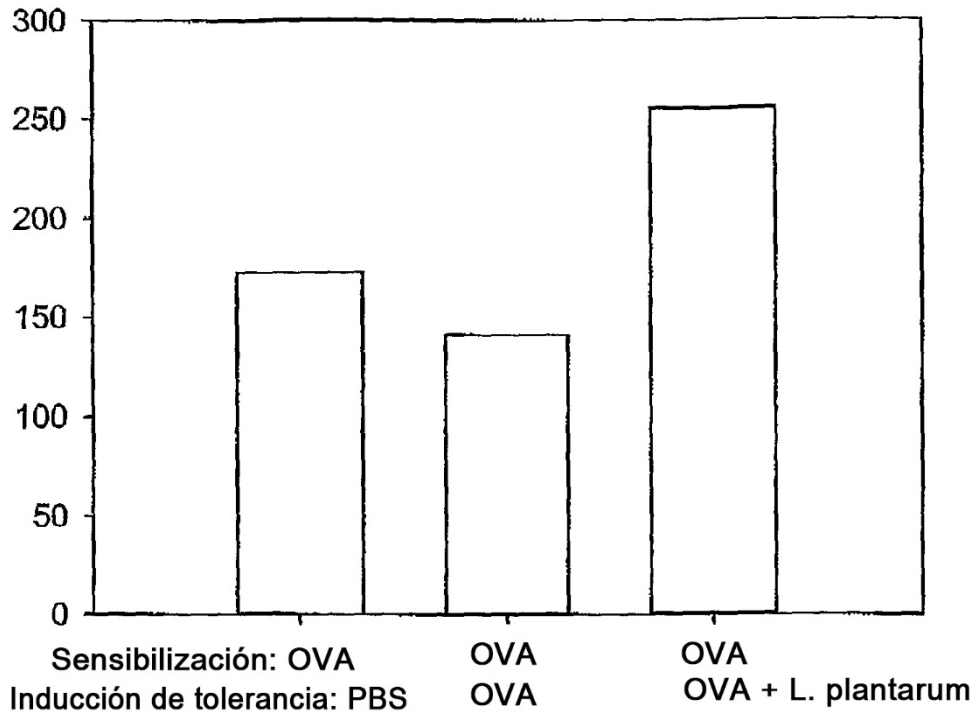


FIG.4A

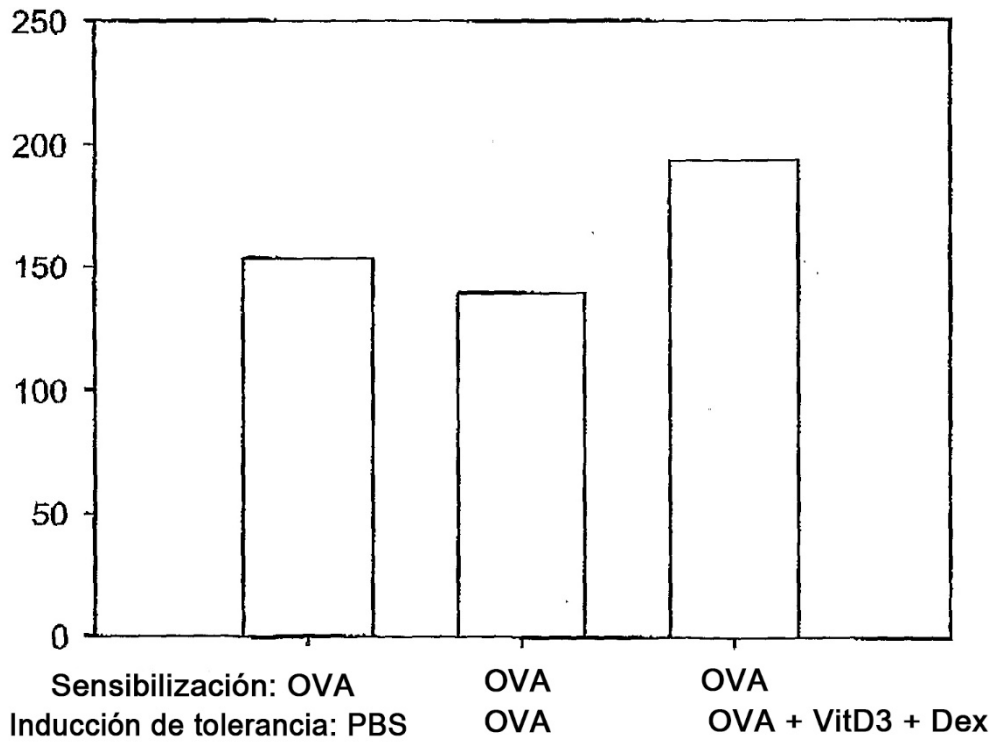


FIG.4B