



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 391**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02758543 .9**

86 Fecha de presentación : **16.08.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1416916**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Micropartículas de quitina y sus usos médicos.**

30 Prioridad: **16.08.2001 GB 0120030**
22.03.2002 GB 0206864

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **CMP THERAPEUTICS LIMITED**
9400 Garsington Road Oxford Business Park
Oxford OX4 2HN, GB

72 Inventor/es: **Strong, Peter**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 295 391 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

Micropartículas de quitina y sus usos médicos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a micropartículas de quitina y a sus usos médicos, en particular en el tratamiento de alergias, afecciones que se beneficiarían de una regulación positiva del sistema inmune mediado por células y afecciones que se beneficiarían de una regulación positiva de la actividad de las células asesinas naturales (NK) y/o la secreción de interferón γ (IFN- γ).

Antecedentes de la invención

Los macrófagos alveolares son los leucocitos más abundantes en el lumen del alveolo y son fundamentales para el sistema inmune innato del pulmón al promover la eliminación fagocítica y al secretar citoquinas que promueven una respuesta inmune mediada por células eficaz frente a materiales en forma de partículas inhalados, incluyendo microbios y patógenos. Las principales citoquinas producidas durante la fagocitosis son IL-12, TNF- α e IL-18. Estas citoquinas de macrófagos posteriormente inducen la producción de IFN- γ a través de las células NK y los linfocitos Th1. El IFN- γ actúa sinérgicamente con estas citoquinas para promover una respuesta inmune Th1 mediada por células y también regular negativamente la producción de citoquinas Th2, en particular IL-4 e IL-5, que son mediadores fuertes de las alergias.

Los estudios de Shibata *et al* (1-4) han demostrado que la administración oral de partículas de quitina que pueden fagocitarse de 1-10 μm resulta en un incremento de citoquinas Th1 en cultivos de células de bazo de ratón. El efecto era específico para el material en forma de partículas, ya que no se producía ningún incremento al administrar quitina soluble. Este efecto también pudo reproducirse en microesferas de poliestireno de 1 μm recubiertas con N-acetil-D-glucosamina, que es el componente principal de la quitina. También se demostró que la administración oral de quitina regula negativamente el nivel sérico de IgE y la eosinofilia pulmonar en un modelo murino de alergia a la ambrosía (1).

Shibata *et al* también han desarrollado un modelo de ratón con inflamación alérgica de las vías respiratorias y preparaciones de quitina administradas por vía oral a los ratones (Shibata 2000). Los niveles de IgE específica de ambrosía se redujeron significativamente después de la administración oral diaria de quitina a ratones sensibilizados a la ambrosía, antes y durante la inmunización. Se recogieron células de lavado bronquioalveolar (BAL) 14 días después de la inmunización y se observó una reducción en los niveles de eosinófilos y en los niveles de linfocitos después del tratamiento con quitina. La inflamación pulmonar se determinó histológicamente 14 días después de la inmunización y la inflamación peribronquial, perivascular y pulmonar total se inhibieron en el grupo tratado con quitina.

Cuando se administró quitina de manera profiláctica a ratones que posteriormente recibieron ambrosía, la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 se redujo significativamente y se detectaron niveles bajos aunque significativos de IFN- γ .

La quitina también tiene un efecto profiláctico cuando se administra a ratones C57BL6, que presentan una mayor respuesta de inmunidad mediada por células/Th1, pero son peores respondedores en relación con las respuestas alérgicas que los ratones BALB/c.

Cuando ratones sensibilizados a la ambrosía se trataron simultáneamente con ambrosía y quitina, los niveles de IL-4, IL-5 e IL-10 producidos se redujeron significativamente en comparación con los estimulados únicamente con ambrosía.

Sin embargo, aunque Shibata *et al* describen el uso de micropartículas de quitina para el tratamiento de las alergias, las composiciones se administran por vía oral como un suplemento para activar macrófagos y para fortalecer profilácticamente el sistema inmune en ausencia de infecciones bacterianas recurrentes que cada vez son menos comunes en los países industrializados.

La solicitud de patente japonesa N° 19997-0087986 A (Unitika Limited) describe el uso de partículas de quitina desacetiladas en forma de polvos, gránulos o fibras para la administración a la mucosa nasal. Las partículas de quitina tienen un diámetro de partículas eficaz de 20 a 250 micrómetros y se proponen para el tratamiento de síntomas alérgicos en un sitio inflamatorio, tal como en caso de polinosis.

Las patentes US N° 5.591.441 y 5.585.106 (Medical Sciences Research Institute) se refieren al uso de composiciones en forma de partículas para proporcionar protección frente a infecciones por microorganismos y por agentes de guerras biológicas. Las composiciones se administran por vía intravenosa con la intención de proporcionar un aumento de corta duración en los niveles de peróxido *in vivo* para destruir los microorganismos. Por medio de inyección intravenosa se administran composiciones ejemplificadas de zimosan, látex o BCG inactivado térmicamente.

En líneas más generales, los tratamientos existentes para las alergias implican típicamente el uso de esteroides para reprimir el sistema inmune. La terapia con esteroides tiene efectos secundarios indeseables. Los fármacos sintéticos,

tales como los esteroides, son caros de fabricar, implicando un proceso complejo que requiere un control de calidad complejo y normas GMP para satisfacer los requisitos de las autoridades sanitarias y de seguridad. Teniendo en cuenta estos factores, sigue siendo un problema en el estado de la técnica encontrar tratamientos eficaces para las alergias.

5 *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista, es una causa destacada de infecciones que ponen en peligro la vida en individuos inmunocomprometidos y es un riesgo importante para pacientes que necesitan un ventilador y en muchas patologías en las que hay una reducción de la función pulmonar y una menor capacidad de eliminar infecciones. Cada año, más de dos millones de pacientes mueren como resultado de esta bacteria. Un informe sobre la incidencia de las infecciones asociadas con los hospitales pone a *P. aeruginosa* entre los tres patógenos notificados con
10 más frecuencia (5). *P. aeruginosa* también es una causa común de infección pulmonar crónica y potencialmente letal en pacientes con fibrosis quística. Ciertos informes recientes presentan a *P. aeruginosa* entre las bacterias resistentes a antibióticos más importantes y una para la que se necesitan vacunas eficaces (6).

15 *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno ubicuo y es responsable de una alta proporción de casos de neumonía (tanto lobar como bronconeumonía) y una de las causas importantes de enfermedades y muerte entre niños pequeños, personas de edad avanzada y personas con el sistema inmune alterado como resultado de enfermedades tales como el SIDA, o de una terapia inmunosupresora tal como la utilizada en el trasplante de médula ósea. La forma invasiva de la infección por estreptococos, en la que las bacterias se diseminan en la sangre y otros órganos, produce complicaciones muy graves. Se estima que, en los Estados Unidos, cada año la enfermedad neumocócica produce 3.000 casos de
20 meningitis, 50.000 casos de bacteremia, 125.000 hospitalizaciones y 6.000.000 de casos de otitis media.

Cada vez hay más preocupación sobre la aparición de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a antibióticos y hay una cantidad considerable de investigación de nuevos tratamientos y vacunas.

25 Descripción resumida de la invención

En sentido amplio, la presente invención se refiere al uso de preparaciones de micropartículas de quitina (CMP) para tratar trastornos por medio de la administración de las micropartículas por vía intranasal en los senos y el tracto respiratorio superior, por ejemplo, usando un pulverizador intranasal, o por inhalación, por ejemplo, dirigiendo a los
30 macrófagos alveolares en los pulmones. Las composiciones de micropartículas de quitina son diferentes a muchas de las descritas en la técnica anterior que tienen un diámetro medio menor de 10 μm y en las que al menos un 60% de las micropartículas de quitina que constituyen las CMP tienen diámetros menores de 10 μm .

Los macrófagos tienen una función de control central en el sistema inmune innato del pulmón al promover la eliminación fagocítica de partículas, al procesar la presentación de alérgenos inalados a los linfocitos y al secretar citoquinas que promueven una respuesta inmune mediada por células eficaz contra las partículas inhaladas, incluyendo microbios y sustancias alergénicas. En particular, la presente invención describe que la administración intranasal de micropartículas de quitina es particularmente eficaz para reducir varios parámetros que indican inflamación, proporcionando de
40 esta manera una alternativa a los tratamientos con esteroides.

El trabajo descrito en este documento se debe al descubrimiento de que la administración intranasal de micropartículas de quitina a modelos de ratón de alergia producida por *Aspergillus fumigatus* (Afu) y *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) es particularmente eficaz para reducir los niveles de eosinofilia en sangre periférica, IgE total en suero, IgG1 específica de Afu, la citoquina IL-4, GM-CSF y una hiperrespuesta de las vías respiratorias (AHR), así
45 como para aumentar los niveles de las citoquinas IL-12, IFN- γ y TNF- α . El pretratamiento intranasal de micropartículas de quitina fue eficaz para prevenir la progresión de infecciones por *P. aeruginosa* o *S. pneumoniae* en ratones infectados con estos patógenos. Además, se ha demostrado que la CMP aumenta la respuesta al TNF α e IFN- γ de leucocitos humanos activados.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de una preparación de micropartículas de quitina (CMP) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una alergia, donde el medicamento se administra por vía intranasal o por inhalación, y donde las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de 10 μm y donde al menos un 60% de las micropartículas de quitina que constituyen las CMP
50 tiene diámetros menores de 10 μm .

55 Ejemplos de alergias que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen alergias respiratorias estacionales, que se conocen comúnmente como fiebre del heno; alergia a aeroalérgenos incluyendo los ácaros del polvo doméstico, esporas fúngicas, polen de gramíneas, polen de árboles y caspa de animales; alergias tratables por medio de la reducción de los niveles séricos de IgE y eosinofilia; asma; eccema y alergias alimentarias; y dermatitis
60 tales como dermatitis atópica.

Pueden emplearse composiciones que comprenden una composición de micropartículas de quitina y un alérgeno en el tratamiento de alergias y síntomas alérgicos, tales como el choque anafiláctico, que están asociados con las terapias de desensibilización convencionales. Se ha demostrado que la aplicación oral de IL-12 reprime las reacciones anafilácticas y, de esta manera, la administración de un alérgeno con una composición CMP debería ayudar a moderar
65 las reacciones anafilácticas que se producen durante la terapia de desensibilización diseñada para conseguir tolerancia a un alérgeno. Los alérgenos pueden extraerse fácilmente a partir de alimentos y están disponibles en el mercado, ya que se usan en el diagnóstico y tratamiento de las alergias. Una aplicación particular de este aspecto de la invención es

ES 2 295 391 T3

en el tratamiento de las alergias alimentarias. Los ejemplos de alérgenos alimentarios comunes incluyen leche, trigo, gluten, huevos, frutos secos o marisco, y el experto podrá formularlos con la composición CMP para la administración a un paciente.

5 En un aspecto alternativo, la presente invención proporciona un kit que comprende:

(a) una composición de micropartículas de quitina como se define en las reivindicaciones; y

(b) un alérgeno alimentario;

10

para la administración simultánea o secuencial a un paciente.

Otra realización específica que implica el tratamiento de la alergia está en el tratamiento de caballos, y en particular de caballos pura sangre, que tienen tendencia a padecer afecciones alérgicas tales como asma o infecciones pulmonares recurrentes.

En un aspecto más, la presente invención proporciona el uso de una preparación de micropartículas de quitina (CMP) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección microbiana, una infección fúngica o una infección vírica, donde el medicamento se administra por vía intranasal o por inhalación, y donde las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de 10 μm y donde al menos un 60% de las micropartículas de quitina que constituyen la CMP tienen diámetros menores de 10 μm .

De esta manera, en este aspecto de la invención, la composición CMP puede usarse para fortalecer el sistema inmune de un individuo. Las afecciones que se benefician de la regulación positiva del sistema inmune mediado por células incluyen el tratamiento de infecciones microbianas, incluyendo infecciones bacterianas, infecciones fúngicas e infecciones víricas, particularmente entre grupos de pacientes vulnerables tales como ancianos, bebés prematuros, niños, pacientes con trasplantes, pacientes inmunodeprimidos tales como pacientes sometidos a quimioterapia, pacientes hospitalarios con riesgo de infecciones oportunistas, pacientes con ventiladores, pacientes con fibrosis quística y pacientes con SIDA. La invención se puede aplicar particularmente al tratamiento de infecciones de oído, nariz, garganta y pulmón.

Los ejemplos específicos de infecciones bacterianas incluyen el tratamiento de infecciones por microorganismos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Streptococcus* tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Listeria*, infecciones por micobacterias incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, infecciones parasitarias incluyendo especies de *Leishmania* y especies de *Schistosoma*.

Una afección producida por infección microbiana, típicamente por *Streptococcus pneumoniae*, es la infección recurrente de oídos tal como la otitis media. Estas afecciones se producen en niños y adultos y actualmente se tratan usando antibióticos. Sería ventajoso usar las composiciones de micropartículas de quitina de la invención para tratar estas afecciones y reducir la necesidad de antibióticos.

Las preparaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de tuberculosis para tratar una infección existente o para proteger a grupos de pacientes vulnerables a las infecciones.

Otros ejemplos de infecciones microbianas incluyen neumonías bacterianas tales como neumonía asociada con ventiladores e infecciones asociadas con la fibrosis quística.

Los ejemplos de infecciones fúngicas incluyen infecciones fúngicas tales como aspergilosis pulmonar invasiva y candidiasis pulmonar invasiva, neumonía por *Pneumocystis carinii*, e infecciones por *Coccidioides* y *Cryptococcus*, por ejemplo, en pacientes inmunodeprimidos.

Los ejemplos de afecciones víricas que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen infecciones víricas pulmonares tales como bronquiolitis producida por el virus sincitial respiratorio, especialmente en lactantes y en ancianos, o las producidas por el virus de la gripe o por rinovirus. Numerosos estudios han demostrado que durante la progresión del SIDA, las células mononucleares pierden su capacidad de secretar IL-2, IL-12 e IFN- γ y producen mayores niveles de IL-4, lo cual facilita la proliferación del virus VIH. Por lo tanto, el tratamiento con CMP, administrada por vía intranasal o por inhalación, será útil para reducir la progresión de la infección por VIH por medio de la restauración de los niveles de IL-12 e IFN- γ .

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una preparación de micropartículas de quitina (CMP) para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, donde el medicamento se administra por vía intranasal o por inhalación, y donde las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de 10 μm y donde al menos un 60% de las micropartículas de quitina que constituyen la CMP tienen diámetros menores de 10 μm .

Un ejemplo de una afección que puede tratarse en este aspecto de la invención es un cáncer, y especialmente un cáncer de pulmón, carcinoma pulmonar o carcinoma nasofaríngeo. Estas afecciones pueden tratarse por medio de la regulación positiva de la actividad de células NK y/o la secreción de IFN- γ por células del sistema inmune.

ES 2 295 391 T3

Preferiblemente, los medicamentos indicados anteriormente son para administración a seres humanos. Los grupos de pacientes preferidos para el tratamiento intranasal con CMP incluirían los que padecen rinitis alérgica estacional y sinusitis, o alergias respiratorias crónicas tales como alergia a los ácaros del polvo doméstico y personas que están tomando esteroides o antihistamínicos. Otros grupos incluyen pacientes hospitalizados sometidos a tratamiento de trastornos pulmonares crónicos, incluyendo infecciones y carcinomas pulmonares.

La quitina es un polímero de N-acetil-D-glucosamina y tiene una estructura similar a la de la celulosa. Es un polisacárido abundante en la naturaleza, que comprende la sustancia córnea del exoesqueleto de cangrejos, gambas, langostas, sepias e insectos, así como hongos. Cualquiera de estas u otras fuentes de quitina son adecuadas para la preparación de las preparaciones CMP para su uso de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, la quitina se produce por medio de su reducción física, por ejemplo, por sonicación o trituración, hasta conseguir partículas que tienen un diámetro menor de 50 μm , más preferiblemente menor de 40 μm , aún más preferiblemente menor de 20 μm , más preferiblemente menor de 10 μm y aún más preferiblemente menor de 5 μm . Como se ha descubierto que los efectos producidos por las micropartículas de quitina son dependientes del tamaño, se prefiere que las micropartículas de quitina tengan diámetros medios menores de 10 μm . El límite superior del tamaño de las partículas de quitina puede definirse funcionalmente por macrófagos que no reconocen a las partículas. El límite inferior del tamaño es menos importante, pero preferiblemente las partículas tienen un diámetro de al menos 1 μm . El límite menor del tamaño se define funcionalmente por las partículas de quitina que se vuelven solubles y, por lo tanto, no son reconocidas por los macrófagos. El tamaño de las partículas y la distribución de tamaños pueden ser determinadas fácilmente por el experto, por ejemplo, usando citometría de flujo o un microscopio. Como alternativa o adicionalmente, las micropartículas de quitina pueden obtenerse recubriendo partículas de vehículo, por ejemplo, formadas a partir de un material biocompatible tal como poliestireno o látex, con N-acetil-D-glucosamina, quitina o un fragmento de la misma, para formar partículas que tienen los tamaños definidos anteriormente, y estas composiciones se incluyen dentro de la citada composición de micropartículas de quitina como se usa en este documento.

Debe reconocerse que, en una composición, las micropartículas de quitina tendrán una distribución de tamaños, típicamente una distribución normal, y que no todas las partículas dentro de una población cumplirán necesariamente estos límites de tamaño. Sin embargo, dentro de una población de micropartículas de quitina que constituyen una preparación CMP, al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, y aún más preferiblemente al menos el 99% de las partículas de quitina tiene una distribución de tamaños dentro de los límites indicados anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo de liberación que comprende un depósito de micropartículas de quitina como se han definido en este documento, y un orificio de liberación adaptado para situarse en la boca o nariz de un paciente, donde el paciente puede ponerse el orificio de liberación en la boca o en la nariz para administrar las micropartículas de quitina. En algunas realizaciones, el dispositivo puede comprender una válvula entre el depósito y el orificio de liberación, de tal forma que la válvula pueda accionarse para controlar la liberación de las micropartículas de quitina. Las micropartículas pueden entrar en la nariz hasta los senos y el tracto respiratorio superior o a través de la boca hasta los macrófagos alveolares por inhalación y/o por medio de un propulsor. Una forma particularmente preferida del dispositivo es un frasco pulverizador nasal que contiene una preparación CMP y, opcionalmente, un vehículo, teniendo el frasco pulverizador un cuello adaptado para la administración nasal.

Además de las micropartículas de quitina, las preparaciones CMP pueden comprender uno o más de un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, propulsor, tampón, estabilizante, agente de isotonicidad, conservante o antioxidante, u otros materiales bien conocidos para los expertos en la materia. Estos materiales no deben tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo.

En las composiciones farmacéuticas se incluyen generalmente conservantes para retrasar el crecimiento microbiano, prolongar la vida útil de las composiciones y permitir envases de múltiples usos. Los ejemplos de conservantes incluyen fenol, metacresol, alcohol bencílico, ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los conservantes se emplean típicamente en el intervalo de aproximadamente un 0,1% a un 1,0% (p/v).

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran a un individuo en una "cantidad profilácticamente eficaz" o en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse una terapia), siendo ésta suficiente para presentar los efectos beneficiosos en el individuo, por ejemplo, proporcionando alivio de una alergia u otra afección o profilaxis durante un periodo aceptable. Típicamente, será una cantidad que produce una actividad terapéuticamente útil proporcionando un efecto beneficioso al individuo. La cantidad real de los compuestos administrados y la velocidad y el curso temporal de la administración dependerán de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad del especialista general y otros médicos, y típicamente tiene en cuenta el trastorno a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (ed), 1980 y Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, Mack Publishing Company, 1995. Las composiciones se administran preferiblemente en dosis-funciones comprendidas entre aproximadamente 0,01 y 100 mg de compuesto activo por kg de peso corporal, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y 10 mg/kg de peso corporal. A modo de ejemplo, esto podría conseguirse

ES 2 295 391 T3

usando un frasco de administración nasal para administrar 4-8 dosis de aproximadamente 0,25 ml de una solución de 5 mg/ml de partículas de CMP.

5 A continuación se describirán realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo haciendo referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras y tablas

10 La figura 1 muestra los resultados del tratamiento de ratones expuestos a Afu con 17 μg de CMP, lo cual produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) en la eosinofilia de sangre periférica.

La figura 2 muestra los resultados del tratamiento de ratones expuestos a Der p y Afu con 4 dosis diarias de 25 μg de CMP, que produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) en la eosinofilia de sangre periférica.

15 La figura 3 muestra una reducción en el nivel sérico de IgE total ($p < 0,0005$) de ratones expuestos a Afu, después del tratamiento con 17 $\mu\text{g}/\text{día}$ de CMP.

20 La figura 4 muestra una reducción en el nivel sérico de IgE total ($p < 0,0005$) de ratones expuestos a Afu, después del tratamiento con 5 dosis diarias de 17 μg de CMP y después de una segunda exposición al alérgeno una semana después.

La figura 5 muestra los resultados del tratamiento de ratones expuestos a Der-p con 5 dosis diarias de 25 μg de CMP, lo cual produjo una reducción significativa ($p < 0,005$) en el nivel sérico de IgE total.

25 La figura 6 muestra una reducción en la IgG1 específica de Afu ($p < 0,01$).

La figura 7 muestra una reducción en la IgG1 específica de Afu ($p < 0,001$) después del tratamiento con 5 dosis diarias de 17 μg de CMP, y después de la segunda exposición al alérgeno una semana después.

30 La figura 8 muestra una reducción en la hiperrespuesta de las vías respiratorias ($p < 0,01$) en ratones expuestos por segunda vez al antígeno de Afu después del tratamiento con CMP.

La figura 9 muestra una reducción en AHR ($p < 0,01$) en ratones expuestos al antígeno de Afu, después de 4 días de tratamiento con CMP.

35 La figura 10 muestra una reducción en AHR, en ratones expuestos al antígeno de Der p después del tratamiento con CMP, frente a concentraciones crecientes de metacolina.

40 La figura 11 muestra una reducción en AHR 3 días después del tratamiento con 25 μg de CMP precedido de la exposición al alérgeno (Der-CMP(0), $p < 0,001$) y una segunda exposición 4 días después (Der-CMP(4), $p < 0,001$).

La figura 12 muestra una reducción en AHR en ratones expuestos a Der-p después de 4 días de tratamiento con dosis variables de CMP, en respuesta a la exposición a metacolina.

45 La figura 13 muestra secciones pulmonares que difieren en el grado de inflamación y obstrucción después del tratamiento con CMP de ratones sensibilizados a Afu.

La figura 14 muestra la supervivencia de ratones pretratados con CMP o control (PBS), en respuesta a la infección por *P. aeruginosa*.

50 La figura 15 muestra el curso temporal para la eliminación de *S. pneumoniae* de pulmones murinos infectados.

La figura 16 muestra el curso temporal para la aparición de *S. pneumoniae* en la sangre de ratones infectados.

55 La figura 17 muestra la potenciación por CMP de la producción de $\text{TNF}\alpha$ por monocitos CD14 activados con LPS.

La figura 18 muestra la potenciación por CMP de la producción de $\text{TNF}\alpha$ por monocitos proinflamatorios CD14/CD16 activados por LPS.

60 La figura 19 muestra una mayor producción de $\text{IFN}\gamma$ a partir de linfocitos T humanos estimulados con PMA/ionomicina por CMP.

La tabla 1a indica aumentos en las citoquinas IL-12, $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ en células de bazo de ratones expuestos a los alérgenos de Der p y Afu en respuesta al tratamiento con CMP.

65 La tabla 1b indica un aumento en la citoquina GM-CSF en células de bazo de ratones expuestos a Der p en respuesta al tratamiento con CMP.

La tabla 1c indica una reducción en la fluorescencia media geométrica de la citoquina IL-4 en respuesta al tratamiento con CMP.

Descripción detallada

5

Materiales y Métodos

Las micropartículas de quitina administradas por vía intranasal representan una nueva estrategia para estimular la inmunidad mediada por células y promover respuestas antiinflamatorias en tejidos inflamados. La presente invención tiene la ventaja considerable de que los macrófagos del tracto respiratorio superior o los macrófagos alveolares pueden dirigirse directamente con micropartículas de quitina del tamaño correcto usando un pulverizador intranasal y administración por inhalación respectivamente.

En el ratón se han establecido dos modelos de alergia, un modelo de infección pulmonar por patógenos y un modelo de infección bacteriana. Además, se ha creado un ensayo *in vitro* que utiliza monocitos o linfocitos humanos, para demostrar la eficacia de la presente invención.

Los parámetros medidos en los modelos de alergia son IgE e IgG1 en suero, eosinofilia de sangre periférica y AHR, que están significativamente elevados en los modelos murinos de alergia a los alérgenos Afu y Der p y se reducen significativamente por el tratamiento intranasal con CMP. Los niveles de las citoquinas IL-12, IFN- γ y TNF α que están reducidos en el modelo de ratón de alergia a Der p se aumentan por el tratamiento intranasal con CMP y los niveles de GM-CSF e IL-4 se reducen. El modo de acción propuesto es que la CMP se une a los receptores de manosa de los macrófagos en la mucosa nasal y en los alveolos, estimulando a los macrófagos y a las células dendríticas para que generen IL-12, TNF- α e IL-18, e invierte la supresión de IL-12 producida por la exposición al alérgeno, volviendo los niveles a los observados en los ratones no alérgicos. Esto conduce a la generación de IFN- γ por células NK y linfocitos Th1. La reducción en GM-CSF e IL-4 indica la modulación de la respuesta inmune de Th2 a Th1. De hecho, todas estas citoquinas, y particularmente el IFN- γ , promueven un cambio en las poblaciones de linfocitos T de Th2 a Th1. El GM-CSF es una citoquina Th2 que promueve la diferenciación, activación y supervivencia de los eosinófilos. Esto culmina en la reducción observada en los niveles séricos de IgE y eosinofilia, que son componentes importantes de la alergia.

En el modelo de ratón de infección pulmonar por patógenos, se midió la supervivencia de ratones pretratados con CMP durante 10 días en respuesta a la infección con *P. aeruginosa*. Los ratones pretratados con CMP mostraron una tasa de supervivencia significativamente mejor que los ratones que no recibieron ningún pretratamiento con CMP.

En el modelo de ratón de infección bacteriana, se midió el curso temporal para la eliminación de *S. pneumoniae* de los pulmones de ratones infectados durante 24 horas. Los ratones pretratados con CMP mostraron unidades formadoras de colonias (cfu) de bacterias en los pulmones significativamente menores ($p < 0,001$) en comparación con los ratones pretratados con PBS. El curso temporal para la aparición de *S. pneumoniae* en la sangre se midió durante 48 horas y la bacteremia sanguínea en los ratones pretratados con CMP fue significativamente menor a las 24 horas ($p < 0,005$) y a las 48 horas que la de los ratones pretratados con PBS.

Se midió la producción de TNF- α en respuesta a la estimulación por LPS en monocitos humanos y se midieron los niveles de IFN- γ en linfocitos T humanos en respuesta a la estimulación por PMA/ionomicina. En los dos ensayos, la adición de CMP aumentó la producción de citoquinas. Este efecto, observado en células humanas, es coherente con el concepto de que las CMP inducen a los monocitos y a los fagocitos por medio de la unión al receptor de manosa u otros receptores de carbohidratos, seguido de la fagocitosis de las CMP. La activación por un producto microbiano tal como lipopolisacárido (LPS) aumenta la capacidad de respuesta de estos monocitos, un efecto mediado por citoquinas derivadas de fagocitos tales como IL-12. CMP también puede promover la actividad de linfocitos Th1, lo cual concuerda con el concepto de que CMP promueve una respuesta inmune Th1 mediada por células.

Preparación de suspensión de micropartículas de quitina (CMP)

Se prepararon micropartículas de quitina a partir de quitina purificada (Sigma-Aldrich, Poole, UK) por sonicación de una suspensión de 10 mg/ml en PBS sin endotoxina a potencia máxima durante 20 minutos con enfriamiento en hielo cada 5 minutos. La suspensión se centrifugó a 1000 xg durante 10 minutos para retirar las partículas grandes y las micropartículas se recogieron por centrifugación a 4000 xg y se lavaron 3 veces con PBS para retirar toda la quitina solubilizada. El sobrenadante contenía una suspensión uniforme de pequeñas partículas a juzgar por la microscopía óptica usando un hemocitómetro con cuadrados de 50 μm y eran comparables en tamaño a esferas de látex de 1 μm (Polysciences, Inc. Warrington, Pennsylvania, USA). Las partículas menores de 5 μm de diámetro se cuantificaron con un Celltac Hematology Analyser (Nihon Kohden, Inc.). Se descubrió que las preparaciones contenían un 99,9% de micropartículas menores de 5 μm de diámetro y en una concentración del orden de 10^{11} /ml. La endotoxina se midió por medio de un ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (BioWhittaker Co.) y se demostró que era < 1 EU/ml.

65

ES 2 295 391 T3

Modelos de Ratón de Alergia

Extractos de alérgenos

5 Se cultivó *Aspergillus fumigatus* (Afu) en un medio sintético (M199, Sigma Chemicals) como un cultivo estacionario durante una semana a 37°C. Arrunda *et al*, demostró que la expresión de Asp f1, un alérgeno principal, es máxima después de una semana y tiende a disminuir durante periodos de incubación más prolongados (7). El cultivo de una semana se destruyó añadiendo Thimerosal al 0,1% durante 12 horas. El cultivo se filtró a través de lana de vidrio y finalmente a través de una membrana de 0,45 μm para retirar todos los materiales en forma de partículas y las posibles esporas y después se dializó con tres cambios de tampón frente a agua. El dializado se liofilizó para dar un polvo de color pardo.

10 Una banda principal a 18 kDa corresponde a Asp f1. También se puede ver una banda que corresponde a Asp f2 (37 kDa). La banda de 18 kDa se secuenció en el extremo N-terminal dando la secuencia ATWTCINQQLNP, que corresponde a la secuencia N-terminal para Asp f1.

También se demostró por medio de un ELISA que el filtrado de cultivo de una semana (1wcf) se reconocía por suero humano de pacientes alérgicos a Afu obtenidos del Instituto Nacional de Patrones Biológicos y Control.

20 Se diluyó un extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) estandarizado (Geer Labs, Lenoir, North Carolina, USA) que contenía 10000 unidades de alergia (AU/ml) en PBS estéril sin endotoxina.

Sensibilización

25 Se sensibilizaron ratones C57BL/6 hembra por medio de cuatro inyecciones semanales i.p. de una mezcla de extracto de alérgeno (68 AU de Der p; 200 μg de Afu) con alumbre en 100 μl de PBS estéril.

Exposición al alérgeno y tratamiento con CMP

30 Se anestesiaron ratones sensibilizados con isoflurano y se expusieron a 50 unidades de alergia de extracto de Der p, o 10 μg de extracto de alérgeno de Afu, en PBS, administrado por vía intranasal seguido de dosis intranasales de PBS o CMP o de un control en forma de partículas (PC) de perlas de poliestireno de 1 μm en 50 μl administradas 1-2 horas después. En un experimento separado, se demostró que aproximadamente un 50% de las microperlas marcadas con FITC administradas por vía intranasal podían recuperarse de los pulmones después de 30 minutos.

Eosinófilos de sangre periférica

35 Se recogió sangre de la vena de la cola de los ratones (n = 4-8/grupo) para la estimación de los eosinófilos. El recuento total de leucocitos se determinó por medio de un contador de células automático y la proporción de eosinófilos se determinó por recuento diferencial de frotis de sangre teñidos por tinción de May-Grunwald-Giemsa. Los resultados se expresan como 10⁶ células /ml.

IgE en suero e IgG1 específica de Afu

45 La IgE total en suero se midió por medio de un ELISA de sándwich (BD PharMigen, Cowley, UK) en sangre diluida en serie desde una dilución máxima de 1:20 para dar valores que eran lineales con respecto a la curva patrón de IgE de ratón. Los resultados se expresan en $\mu\text{g}/\text{ml}$. La IgG1 específica de antígeno se midió por ELISA usando placas de 96 pocillos recubiertas con extracto de alérgeno. El anticuerpo se detectó con IgG1 anti-ratón marcada con HRP. Los resultados se expresan como unidades de absorbancia relativa (DO450).

Tinción de citoquinas intracelulares.

50 Después del tratamiento, los ratones se sacrificaron de forma humanitaria por asfixia con CO₂ y sus bazos se extrajeron y se homogeneizaron en PBS. El homogeneizado se filtró y los glóbulos rojos se lisaron con el reactivo de lisis de cloruro amónico (BD Pharmingen, Cowley, UK) y se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) durante 20 minutos. Las células se lavaron con PBS suplementada con suero bovino fetal inactivado con calor al 3% con azida sódica (FSB) al 0,1% (p/v), se resuspendieron en DMSO al 10% (v/v) en FSB y se almacenaron a -80°C. Las células se permeabilizaron con tampón de lavado Cytoperm (CPB, BD Biosciences, Cowley, UK) durante 15 minutos a 4°C y se bloquearon alícuotas de 10⁶ células por incubación durante 30 minutos a 4°C con CPB suplementado con IgG de rata al 1% (v/v). Las citoquinas intracelulares se teñieron con 1 μg de anticuerpo monoclonal anti-citoquina de ratón conjugado con PE (BD Biosciences, Cowley, UK) incubado durante 60 minutos a 4°C. Las células se lavaron con CPB seguido de FSB y se resuspendieron en 500 μl de FSB. Se realizó una citometría de flujo con un citómetro de flujo FACScan (Beckton Dickinson, Mountain View, California, USA) usando el software CellQuest. Se recogieron los datos para 20000 células. El valor medio de FCS de las células de bazo fue 100 en todos los casos. Se analizaron las células teñidas (FSC>100, FL2>100) y se calculó la proporción de estas células que se teñían intensamente para PE (PE>1000). Los resultados se expresan como el porcentaje de células teñidas intensamente después de restar la fluorescencia de fondo de las células no teñidas incubadas con IgG de rata (% PE >1000). En el caso de la IL-4, se midió la fluorescencia media geométrica (GMF) para las células teñidas y se restó el efecto de fondo.

ES 2 295 391 T3

Histología de pulmón

Inmediatamente después del tratamiento, los pulmones de 2-4 ratones de cada grupo de tratamiento se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% y se enviaron para un análisis independiente. Los pulmones se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los cortes se evaluaron con respecto a la inflamación peribronquial y se asignaron puntuaciones en una escala de 0 a 4 que correspondían a una puntuación de normal a severa, respectivamente (9).

Pletismografía de cuerpo entero

En este estudio, se midió la AHR usando una pletismografía de cuerpo entero no restringida (8) con un sistema de cuatro cámaras (Buxco, Sharon, Connecticut, USA). Los ratones se expusieron primero a antígeno intranasal y se dejaron recuperar durante 2 horas antes de ponerse en las cámaras y de controlar su respiración durante 10 minutos. Cuando se aclimataron, se midieron sus respuestas basales durante 5 minutos. Después, los ratones se sometieron a 1 minuto de PBS aerosolizada, seguido de dosis progresivamente crecientes de metacolina (5, 10, 20, 30, 40 mg/ml de PBS). En todos los casos, las respuestas se registran durante 5 minutos con un corto intervalo entre medias para permitir la vuelta al punto basal. Las respuestas se cuantificaron usando la medición de la pausa espiratoria aumentada (Penh). Cada grupo contenía 4-8 ratones. El valor de Penh se mide como el aumento en el porcentaje medio con respecto al valor basal para los ratones de cada grupo. Los resultados se presentan como el porcentaje de elevación media de Penh después de una exposición a metacolina. Para determinar si el tratamiento producía un efecto duradero, los ratones del experimento de Der p se volvieron a exponer al extracto de alérgeno administrado únicamente por vía intranasal, 4 días después de finalizar el tratamiento.

Parámetros estadísticos

Los resultados son la media de 4-8 ratones/grupo y las barras de error son \pm SEM. La significancia se determinó por el ensayo t de Student bilateral. Se aceptó una significancia para $p < 0,05$.

Modelo de ratón de infección pulmonar por patógenos

Pretratamiento con CMP y exposición a patógenos

Se anestesiaron ratones hembra NMRI con ketamina/xilazina y se trataron diariamente durante 3 días con 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de CMP o 20 μl de PBS como control. El día 0, los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina y se expusieron a 2×10^6 *P. aeruginosa* por vía intranasal. La supervivencia de los animales se midió durante 10 días.

Modelo de ratón de infección bacteriana

*Preparación de *S. pneumoniae**

Se obtuvo *S. pneumoniae* serotipo 2, cepa D39, de la National Collection of Type Cultures, London, UK (NCTC 7466). Las bacterias se identificaron como neumococos antes de la infección por tinción Gram, ensayo de catalasa, hemólisis en placas de agar con sangre y por sensibilidad a optoquina. Los serotipos de los polisacáridos capsulares se confirmaron por la reacción de Quellung. Para uso en experimentos de infección *in vivo*, se cultivaron neumococos y se pasaron a través de los ratones como se ha descrito previamente (10) y posteriormente se almacenaron a -70°C . Cuando fue necesario, las suspensiones se descongelaron a temperatura ambiente y las bacterias se recogieron por centrifugación antes de la resuspensión en PBS estéril.

Infección de ratones

Ratones exogámicos MF-1 hembra, de 9 semanas de edad y que pesaban 30-35 g (Harian Olac, Bichseter, UK), se anestesiaron ligeramente con fluotano al 2,5% (vol/vol) (AstraZeneca, Macclesfield, UK) sobre oxígeno (1,5-2 litros/min). Se administraron 50 μl de PBS que contenían 1×10^6 cfu de *S. pneumoniae* en los orificios nasales de los ratones. El inóculo se confirmó por cultivo en placas de agar con sangre después de las infecciones. A intervalos de una hora después de la infección, grupos preseleccionados de ratones se anestesiaron profundamente con fluotano al 5% (vol/vol) antes de recoger sangre por medio de una punción cardíaca. Después de este procedimiento, los ratones se sacrificaron inmediatamente por dislocación cervical. El pulmón se introdujo en 10 ml de agua destilada estéril, se pesó y después se homogeneizó en un mezclador Stomacher-Lab (Seward Medical, London, UK). Los recuentos viables de los homogeneizados y de la sangre se determinaron como se ha indicado anteriormente (10). La presencia de cápsulas de polisacárido de tipo 2 se confirmó por la reacción de Quellung. Estos ratones no tuvieron niveles detectables de anticuerpos anti-tipo 2, anti-tipo 3 o anti-neumolisina.

Estrategia de tratamiento

Los días 1, 2, y 3 los ratones recibieron 250 μg de CMP en 50 μl de PBS estéril, administrados por vía intranasal cuando los ratones estaban anestesiados. El día 3, los ratones recibieron la exposición intranasal con *S. pneumoniae* y se sacrificaron a intervalos de una hora.

ES 2 295 391 T3

Producción de citoquinas en leucocitos humanos

Efecto de la administración de CMP sobre los monocitos humanos

5 Se obtuvo sangre de tres donantes sanos y se añadieron 10 U/ml de heparina como anticoagulante. Se incubaron
alícuotas de 0,6 ml con 10 $\mu\text{g/ml}$ de brefeldina A (BFA), un inhibidor de la secreción de proteínas desde las células y 5
ng/ml de LPS derivado de *Salmonella minnesota*, con o sin 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de CMP. La incubación se realizó a 37°C durante
6 horas. Después de la incubación, los glóbulos rojos se lisaron con tampón cloruro amónico y se resuspendieron en
10 tampón de tinción FACS. Los marcadores de la superficie celular CD14 y CD16 se tiñeron con anticuerpo marcado
con fluorescencia, después de la permeabilización celular con saponina. La especificidad de tinción para el TNF α
se demostró realizando la tinción de citoquina intracelular en presencia de un exceso de 9 veces de TNF α humano
recombinante. Después del análisis FACS de las células teñidas, se analizaron las poblaciones de CD14 o CD14/CD16
y los resultados se proporcionan como la intensidad de fluorescencia media (MFI) para la tinción de TNF α después
de restar la tinción de fondo para cada donante.

15

Efecto de la administración de CMP sobre linfocitos T humanos

Se incubaron alícuotas de sangre de dos donadores con BFA y 5 ng/ml de PMA + ionomicina 0,25 μM como
activador de las células T en presencia o ausencia de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de CMP durante 6 horas a 37°C. Las células T se
20 tiñeron en relación con el marcador de superficie CD2 y se tiñeron en relación con IFN γ por tinción de citoquinas
intracelulares.

Resultados

25

Ejemplo 1

En la figura 1 se muestra el efecto del tratamiento con CMP sobre la eosinofilia en sangre de animales expuestos
a Afu. Los grupos habían recibido el tratamiento durante 4 días y las mediciones se realizaron el día 5. El tamaño de
30 muestra fue de 4-5 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. Los resultados indican que el tratamiento con CMP tuvo
como resultado una reducción en el nivel de eosinofilia sanguínea a aproximadamente 0,3 x 10⁶/ml, en comparación
con los animales de ensayo tratados con PBS que presentaron niveles sanguíneos de eosinofilia de aproximadamente
0,7 x 10⁶/ml.

35

Ejemplo 2

En la Figura 2 se muestra el efecto del tratamiento con CMP sobre la eosinofilia en sangre periférica de ratones
expuestos a Der p y Afu. Los grupos se expusieron diariamente con extracto de Afu o Der p, administrado por vía
40 intranasal, seguido del tratamiento intranasal con cuatro dosis diarias de 25 μg de CMP. PBS representa los ratones no
sensibilizados tratados con PBS. Der-PC representa los ratones sensibilizados con un control en forma de partículas
(PC) de perlas de látex. El tamaño de muestra fue de 4-8 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. La eosinofilia de
sangre periférica se redujo en un 36% en el modelo de Der p y en un 58% en el modelo de Afu ($p < 0,05$).

45

Ejemplo 3

En la Figura 3 se muestra una comparación del efecto del tratamiento con CMP sobre los niveles séricos de IgE de
ratones expuestos a Afu. Los grupos se trataron durante 5 días y las mediciones se realizaron en sangre recogida 3 días
50 después. El tamaño de la muestra fue de 4-5 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. Los resultados indican que los
niveles de IgE en suero tres días después del tratamiento intranasal con CMP (Afu-quitina) son menores de 5 $\mu\text{g/ml}$
de IgE, en comparación con los 24 $\mu\text{g/ml}$ de IgE en los animales sensibilizados tratados con PBS (Afu-PBS). PBS
representa ratones no sensibilizados tratados con PBS.

55

Ejemplo 4

En la Figura 4 se muestra el efecto del tratamiento con CMP sobre los niveles séricos de IgE de ratones expuestos a
Afu. Los grupos se expusieron diariamente a extracto de Afu, administrado por vía intranasal, seguido del tratamiento
60 intranasal con 5 dosis diarias de 17 μg de CMP (A-CMP1) o PBS (A-PBS1) administradas una hora después. Los
ratones se volvieron a exponer con tres dosis intranasales diarias de extracto de alérgeno administrado solo la semana
siguiente y se volvieron a medir los niveles de IgE en sangre (A-PBS2, A-CMP2). El tamaño de la muestra fue de
4-8 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. Los resultados indican una reducción significativa de la IgE en suero
($p < 0,0005$), que se mantuvo después de la segunda exposición al alérgeno, una semana después ($p < 0,0005$).

65

ES 2 295 391 T3

Ejemplo 5

En la Figura 5 se muestra el efecto del tratamiento con CMP sobre los niveles séricos de IgE de ratones expuestos a Der p. Los grupos se expusieron diariamente a extracto de Der p, administrado por vía intranasal, seguido del tratamiento intranasal con 5 dosis diarias de PBS (DerPBS), 25 μ g de CMP (DerCMP) o 25 μ g de un control en forma de partículas de perlas de látex (DerPc). PBS representa los ratones no sensibilizados tratados con PBS, administrada una hora después. El tamaño de la muestra fue de 4-8 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. El tratamiento con 5 dosis diarias de 25 μ g de CMP produjo una reducción significativa de la IgE total en suero ($p < 0,005$), medida cuatro días después del tratamiento.

Ejemplo 6

En la Figura 6 se muestra una comparación del efecto del tratamiento con CMP o PBS sobre los niveles séricos de IgG1 de ratones expuestos a Afu. Los grupos se expusieron y se trataron diariamente durante 5 días con PBS o 25 μ g de CMP administrados por vía intranasal y se tomaron mediciones en la sangre recogida 3 días después. El tamaño de la muestra fue de 4-5 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. Los animales sensibilizados expuestos por vía intranasal a extracto de alérgeno de Afu, seguido del tratamiento intranasal con CMP (Afu-CMP) mostraron una reducción de cuatro veces en los niveles séricos de IgG1 con respecto a los animales sensibilizados tratados con PBS (Afu-PBS). PBS representa los ratones no sensibilizados tratados con PBS.

Ejemplo 7

En la Figura 7 se muestra el efecto del tratamiento con CMP sobre los niveles de IgG1 específica de Afu de ratones expuestos a Afu. Los grupos se expusieron diariamente con extracto de Afu, administrado por vía intranasal, seguido del tratamiento intranasal con 5 dosis diarias de 17 μ g de CMP (A-CMP1) o PBS (A-PBS1) una hora después. Los ratones se volvieron a exponer con tres dosis de extracto de alérgeno solo la semana siguiente y se volvieron a medir los niveles de IgG1 en sangre (A-PBS2, A-CMP2). El tamaño de la muestra fue de 4-8 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. Los resultados indican una reducción significativa de la IgG1 específica de Afu en suero ($p < 0,001$), que se mantuvo después de la segunda exposición al alérgeno, una semana después ($p < 0,01$).

Ejemplo 8

En la figura 8 se muestra el efecto de la segunda exposición al alérgeno sobre la AHR de ratones expuestos a Afu. Los grupos se trataron con exposiciones intranasales de alérgeno Afu seguido de tratamiento intranasal con PBS (Afu-PBS) o 20 μ g de CMP (Afu-CMP) y el tratamiento se repitió diariamente durante 4 días. Los ratones se volvieron a exponer solo al alérgeno y se midió la AHR en respuesta a la provocación con 30 mg/ml de metacolina nebulizada. PBS representa los ratones no sensibilizados tratados con PBS. El tamaño de la muestra fue de 4-8 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. Los resultados indican que la AHR se reducía significativamente ($p < 0,01$) en los animales tratados con CMP. Estos ratones mostraron únicamente un aumento del 110% en Penh con respecto a los ratones de control cuando se expusieron a metacolina, en comparación con un aumento del 240% para los ratones tratados con PBS.

Ejemplo 9

En la figura 9 se muestra la hiperrespuesta de las vías respiratorias de ratones expuestos a Afu, en respuesta a una exposición a 20 mg/ml de metacolina nebulizada. Los grupos recibieron 4 dosis diarias de PBS o 25 μ g de CMP por vía intranasal. El tamaño de la muestra fue de 4-8 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. Se observó una reducción significativa en la AHR en el grupo tratado con CMP ($p < 0,01$). El tratamiento con el control en forma de partículas de perlas de látex (A-PC) no redujo la AHR.

Ejemplo 10

En la figura 10 se muestra la respuesta a dosis de grupos de tratamiento expuestos a Der p frente a la metacolina nebulizada. Los grupos primero recibieron una exposición intranasal de extracto de Der p seguido del tratamiento intranasal con PBS (Der-PBS) o 25 μ g de CMP (Der-CMP), y el tratamiento se repitió durante 4 días. Los ratones se volvieron a exponer a Der p 4 días después de completar el curso de exposición/tratamiento. La AHR se midió en respuesta a diferentes dosis de metacolina nebulizada. PBS representa los ratones no sensibilizados tratados con PBS. El tamaño de la muestra fue de 4-8 ratones/grupo. Barras de error \pm SEM. Los resultados indican una AHR reducida a todas las concentraciones de metacolina ensayada.

ES 2 295 391 T3

Ejemplo 11

En la figura 11 se muestra la AHR de ratones expuestos a Der p en respuesta a metacolina nebulizada. Los grupos se trataron durante 3 días con 25 μg de CMP por vía intranasal, precedidos por la exposición al alérgeno (Der p(0)) y se volvieron a exponer solo al alérgeno 4 días después de terminar el tratamiento, con un total de 4 dosis diarias de 25 μg de CMP precedidas por la exposición al alérgeno (Der-CMP(4)). PBS representa los ratones no sensibilizados tratados con PBS. Los resultados se expresan como el ascenso de Penh y muestran una reducción significativa en AHR el cuarto día de tratamiento (Der-CMP(0), $p < 0,001$) y después de una segunda exposición 4 días después del tratamiento (Der-CMP(4), $p < 0,001$).

Ejemplo 12

En la figura 12 se muestra la AHR de ratones sensibilizados a Der p (H=Der p) tratados con CMP. Los grupos se trataron durante 4 días con cuatro dosis diferentes de CMP (5-40 μg). El día 4, los ratones se expusieron a Der p y se trataron 1-2 horas después con CMP o un tratamiento de control del sobrenadante de CMP, sin CMP, procedente de una suspensión de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Psn). Se midió la AHR después de la exposición a 100 mg/ml de metacolina nebulizada durante 1,5 minutos. P representa los ratones no sensibilizados. Los resultados demuestran que todas las dosis de CMP fueron igualmente eficaces y sugieren que puede usarse una dosis cinco veces menor que la usada en los experimentos previos para prevenir una respuesta alérgica en este modelo.

Ejemplo 13

En la figura 13 se muestran secciones pulmonares teñidas con hematoxilina y eosina, que ilustran las diferencias en el grado de inflamación y obstrucción de las vías respiratorias después del tratamiento de ratones sensibilizados a Afu con CMP. La inflamación peribronquial de los ratones expuestos a alérgenos tratados con PBS dio una puntuación media de 2,5 en comparación con la puntuación de 1 para los ratones tratados con CMP también expuestos al alérgeno. Esto representa una reducción del 60% en la inflamación inducida por alérgeno. Los ratones no sensibilizados tratados con PBS dieron una puntuación de 0. La figura 13a muestra el pulmón del ratón normal después del tratamiento con PBS, 13b muestra el pulmón alérgico tratado con PBS y 13c muestra el pulmón alérgico después del tratamiento intranasal con 4 dosis diarias de 25 μg de CMP.

Ejemplo 14

En la tabla 1a se muestra el efecto del tratamiento sobre los niveles de IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-4 en ratones expuestos a Der p y Afu. Los grupos recibieron 4 dosis diarias de extracto de alérgeno seguido del tratamiento intranasal con 25 μg de CMP o un control de partículas no específico de microperlas de poliestireno (PC). La actividad productora de citoquinas se evaluó midiendo la proporción de células muy teñidas positivas para el anticuerpo anti-citoquina respectivo marcado con ficoeritrina. Se muestran los resultados \pm SEM. La IL-12 se elevó significativamente en un 77% (Der-CMP, $p < 0,005$) en el modelo de Der p y se elevó en un 43% (Afu-CMP) en el modelo de Afu. El control de partículas no elevó los niveles de IL-12. El IFN- γ se elevó significativamente en un 41% (Der-CMP, $p < 0,05$) en el modelo de Der p y en un 22% (Afu-CMP, $p < 0,005$) en el modelo de Afu. El TNF- α se elevó significativamente en un 44% (Der-CMP, $p < 0,05$) en el modelo de Der p y en un 22% (Afu-CMP, $p < 0,05$) en el modelo de Afu. El efecto del tratamiento sobre los niveles de GM-CSF en ratones expuestos a Der p se muestra en la tabla 1b. Los ratones se trataron con 40 μg de CMP. El GM-CSF se midió por tinción de citoquinas intracelulares y por citometría de flujo. El tratamiento con CMP produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) en el nivel de GM-CSF con respecto al tratamiento con PBS sola y alcanzó los niveles vistos en ratones no alérgicos sobre los que no se había experimentado previamente. La comparación de la fluorescencia media geométrica (GMF) de células de bazo teñidas para IL-4 (tabla 1c) mostró una reducción del 34% (Der-CMP) en el modelo de Der p y de un 27% (Afu-CMP) en el modelo de Afu. No se observó ninguna reducción con el control de partículas.

Ejemplo 15

En la figura 14 se muestra el efecto del pretratamiento con CMP sobre ratones infectados por *P. aeruginosa*. Los ratones se pretrataron durante tres días con 250 μg de CMP en PBS, por vía intranasal, antes de la infección intranasal con 2×10^9 de *P. aeruginosa*. Se midió la supervivencia de los animales durante 10 días. El experimento se realizó dos veces y los resultados se combinaron. Un día después de la exposición a los patógenos, el 40% de los ratones tratados con el control murieron mientras que, por el contrario, los ratones tratados con CMP mostraron una tasa de supervivencia del 100%. Tres días después de la exposición al patógeno, habían muerto el 70% de los ratones tratados con el control, mientras que los ratones tratados con CMP presentaron una tasa de supervivencia del 80%. No se observó ningún cambio en estas tasas de supervivencia hasta 10 días después de la infección.

ES 2 295 391 T3

Ejemplo 16

En la figura 15 se muestra el efecto del pretratamiento con CMP de 250 μm sobre la eliminación pulmonar de *S. pneumoniae* en ratones. No se observó ninguna diferencia entre los ratones tratados con PBS y los tratados con CMP de 0-12 horas; sin embargo, en el punto de tiempo de 24 horas los ratones tratados con CMP tenían significativamente menos cfu bacterianas en los pulmones ($p < 0,001$).

Ejemplo 17

En la figura 16 se muestra el efecto del pretratamiento con CMP de 250 μm sobre la aparición de *S. pneumoniae* en la sangre de ratones infectados. No se observaron bacterias en el punto de tiempo de 12 horas y la bacteremia sanguínea fue significativamente menor a las 24 horas ($p < 0,005$) y a las 48 horas, lo que sugiere que la CMP protege a los pulmones en 12-24 horas.

Ejemplo 18

En la figura 17 se muestra el efecto de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de CMP sobre la producción de TNF- α en monocitos humanos CD14 activados por LPS. Hubo muy poca producción de TNF- α por los monocitos incubados con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de CMP sola. Sin embargo, la incubación de la sangre con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de CPM suplementada con 5 ng/ml de LPS como activador de monocitos produjo una elevación significativa ($p < 0,001$) en la producción de TNF- α medida en los monocitos CD14⁺ en comparación con las células estimuladas con LPS solo.

Ejemplo 19

En la figura 18 se muestra el efecto de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de CMP sobre la producción de TNF- α en monocitos humanos proinflamatorios CD14/CD16 activados por LPS. Hubo muy poca producción de TNF- α en monocitos proinflamatorios incubados sin CMP o LPS. La incubación con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de CMP suplementada con 5 ng/ml de LPS produjo una elevación de la producción de TNF- α de aproximadamente 350 MFI, en comparación con las células estimuladas con LPS solo.

Ejemplo 20

En la figura 19 se muestra la producción de IFN γ a partir de linfocitos T humanos estimulados con PMA/ionomicina por 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de CMP. La adición de CMP elevó la producción de IFN γ en un 20% a partir de linfocitos T CD2⁺ estimulados con PMA/ionomicina cultivados *in vitro*. Los resultados indican que las CMP pueden promover la actividad o proliferación de linfocitos Th1.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1

a) Porcentaje de tinción por encima del control de isotipo (%PE>1000)									
Citoquina	PBS	Der-PBS	Der-CMP	Der-PC	PBS	Afu-PBS	Afu-CMP	Afu-PC	
IL-12	3,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	4,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,0 ± 1,0	11,5 ± 6,0	19,0 ± 7,0	12,0 ± 4,0	
IFN- γ	11,6 ± 2,7	5,8 ± 1,2	9,8 ± 1,6	-	30,0 ± 3,0	24,0 ± 2,0	32,0 ± 2,0	27,0 ± 1,0	
TNF- α	4,0 ± 2,5	4,2 ± 1,0	10,0 ± 2,5	-	6,5 ± 2,0	12,5 ± 2,5	16,5 ± 3,0	-	
b) Porcentaje de tinción por encima del control de isotipo (%PE>1000)									
Citoquina	Naive	Der-PBS	Der-CMP	Der-PC					
GM-CSF	0,47 ± 0,05	0,75 ± 0,08	0,48 ± 0,07	-					
c) Fluorescencia media geométrica									
Citoquina	PBS	Der-PBS	Der-CMP	Der-PC	PBS	Afu-PBS	Afu-CMP	Afu-PC	
IL-4	16,5 ± 3,5	29,0 ± 9,0	19,0 ± 3,0	26,5 ± 7,5	16,5 ± 3,5	13,0 ± 1,0	7,0 ± 2,0		

Referencias

1. **Shibata et al**, *J. Immunol.*, 164: 1314-1321, 2000.
- 5 2. **Shibata et al**, *J. Immunol.*, 161: 4283-8, 1998.
3. **Shibata et al**, *Infection and Immunity*, 65(5): 1734-1741, 1997.
- 10 4. **Shibata et al**, *J. Immunol.*, 159: 2462-2467, 1997.
5. **Horan et al**, *Mor. Mortal Wkly. Rep. CDC Surveill. Summ.*, 35: 17SS-29SS, 1986.
6. **Davies J.**, *Nature*, 383: 219-220, 1996.
- 15 7. **Arruda et al**, *J. Immunol.* 149:3354-9, 1992.
8. **Hamelmann et al**, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 766-775, 1997.
9. **Sur et al**, *J. Immunol.*, 162: 6284-6293, 1999.
- 20 10. **Kadioglu et al**, *Infect. Immun.*, 2: 492-501. 2000.

Referencias citadas en la descripción

25 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. No forma parte del documento de patente Europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- JP 199970087986 A [0009]
- US 5591441 A [0010]
- 35 • US 5585106 A [0010]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 40 • Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0040]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. *Mack Publishing Company*, 1995 [0040]
- 45 • **SHIBATA et al**. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, 1314-1321 [0091]
- **SHIBATA et al**. *J. Immunol.*, 1998, vol. 161, 4283-8 [0091]
- **SHIBATA et al**. *Infection and Immunity*, 1997, vol. 65 (5), 1734-1741 [0091]
- 50 • **SHIBATA et al**. *J. Immunol.*, 1997, vol. 159, 2462-2467 [0091]
- **HORAN et al**. *Mor. Mortal. Wkly. Rep. CDC Surveill. Summ.*, 1986, vol. 35, 17SS-29SS [0091]
- **DAVIES J.** *Nature*, 1996, vol. 383, 219-220 [0091]
- 55 • **ARRUDA et al**. *J. Immunol.*, 1992, vol. 149, 3354-9 [0091]
- **HAMELMANN et al**. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997, vol. 156, 766-775 [0091]
- 60 • **SUR et al**. *J. Immunol.*, 1999, vol. 162, 6284-6293 [0091]
- **KADIOGLU et al**. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 2, 492-501 [0091]

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una preparación de micropartículas de quitina (CMP) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una alergia, donde el medicamento se administra por vía intranasal o por inhalación y donde las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de 10 μm y al menos un 60% de las micropartículas de quitina que constituyen la preparación de CMP tienen diámetros menores de 10 μm .
- 10 2. Uso de la reivindicación 1, donde la alergia es una alergia respiratoria estacional; alergia a aeroalérgenos; alergia que puede tratarse reduciendo la IgE y la eosinofilia en suero; asma; eccema; alergia alimentaria; dermatitis; o el tratamiento de alergias por desensibilización alérgica.
- 15 3. Uso de la reivindicación 2, donde el aeroalérgeno es un ácaro del polvo doméstico, esporas fúngicas, polen de gramíneas, polen de árboles o caspa de animales.
4. Uso de la reivindicación 2, donde la dermatitis es dermatitis atópica.
5. Uso de la reivindicación 1, donde la composición de micropartículas de quitina es para la desensibilización alérgica y comprende además un alérgeno.
- 20 6. Uso de la reivindicación 5, donde el alérgeno es un alérgeno alimentario.
7. Uso de la reivindicación 6, donde el alérgeno alimentario se encuentra en leche, trigo, gluten, huevos, frutos secos o marisco.
- 25 8. Uso de la reivindicación 1, donde el medicamento se usa para tratar a un animal.
9. Uso de la reivindicación 8, donde el animal es un caballo y la alergia es asma o está asociada con una infección pulmonar recurrente.
- 30 10. Uso de una preparación de micropartículas de quitina (CMP) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección microbiana, una infección fúngica o una infección vírica, donde el medicamento se administra por vía intranasal o por inhalación y las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de 10 μm y al menos un 60% de las micropartículas de quitina que constituyen la preparación de CMP tienen diámetros menores de 10 μm .
- 35 11. Uso de la reivindicación 10, donde la infección microbiana es una infección bacteriana.
12. Uso de la reivindicación 10, donde la infección es una infección de oídos, de nariz, de garganta o de pulmón.
- 40 13. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde el medicamento se usa para el tratamiento de un paciente con riesgo de desarrollar una infección.
14. Uso de la reivindicación 13, donde el paciente con riesgo es una persona de edad avanzada, un bebé prematuro, un niño, un paciente de trasplante, un paciente inmunodeprimido, un paciente sometido a quimioterapia, un paciente hospitalario con riesgo de infecciones oportunistas, un paciente con un ventilador, un paciente con fibrosis quística o un paciente con SIDA.
- 45 15. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde la infección bacteriana se produce por *Pseudomonas aeruginosa*, una especie de *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Listeria*, una especie de *Mycobacteria* o una infección parasitaria.
- 50 16. Uso de la reivindicación 15, donde la especie de *Streptococcus* es *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyrogenes* o *Streptococcus agalactiae*.
- 55 17. Uso de la reivindicación 15, donde la especie de *Mycobacteria* es *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium leprae*.
18. Uso de la reivindicación 15, donde la infección parasitaria es una infección por una especie de *Leishmania* y una especie de *Schistosoma*.
- 60 19. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde la infección es una neumonía bacteriana tal como la neumonía asociada con ventilador o infecciones asociadas con la fibrosis quística.
20. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde la afección es otitis media.
- 65 21. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 12 a 14, donde la infección fúngica es aspergilosis pulmonar invasiva y candidiasis pulmonar invasiva, neumonía por *Pneumocystis carinii* o una infección por *Coccidioides* o *Cryptococcus*.

ES 2 295 391 T3

22. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 12 a 14, donde la afección es una infección pulmonar vírica.
23. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 12 a 14, donde la infección vírica se produce por infección por el virus sincitial respiratorio que produce la bronquiolitis, por el virus de la gripe o por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).
24. Uso de una preparación de micropartículas de quitina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer, donde el medicamento se administra por vía intranasal o por inhalación y las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de $10\ \mu\text{m}$ y al menos un 60% de las micropartículas de quitina que constituyen la preparación CMP tienen diámetros menores de $10\ \mu\text{m}$.
25. Uso de la reivindicación 24, donde la afección es cáncer de pulmón, carcinoma pulmonar o carcinoma nasofaríngeo.
26. Uso de la reivindicación 24, donde la afección es un trastorno pulmonar crónico.
27. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medicamento se administra de manera profiláctica.
28. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de $5\ \mu\text{m}$.
29. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las micropartículas de quitina tienen un tamaño medio de al menos $1\ \mu\text{m}$ de diámetro.
30. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos un 75% de las micropartículas de quitina que constituyen la preparación CMP tienen diámetros menores de $10\ \mu\text{m}$.
31. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos un 90% de las micropartículas de quitina que constituyen la preparación CMP tienen diámetros menores de $10\ \mu\text{m}$.
32. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las micropartículas de quitina proceden de los exoesqueletos de cangrejos, gambas, langostas, sepia e insectos y hongos.
33. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las micropartículas de quitina se pueden obtener por sonicación o trituración de quitina purificada.
34. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las micropartículas de quitina son obtenibles recubriendo partículas de vehículo con N-acetil-D-glucosamina, quitina o un fragmento de las mismas.
35. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medicamento se administra a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz comprendida entre 0,01 y 100 mg del compuesto activo por kg de peso corporal.
36. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medicamento se administra a seres humanos.
37. Uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la preparación de micropartículas de quitina comprende uno o más de un excipiente farmacéuticamente aceptable, un vehículo, un propulsor, un tampón, un estabilizante, un agente para proporcionar isotonicidad, un conservante o un antioxidante.
38. Dispositivo de liberación para la administración de una preparación de micropartículas de quitina, que comprende:
- a) un depósito que contiene una preparación de micropartículas de quitina (CMP), donde las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de $10\ \mu\text{m}$ y al menos el 60% de las micropartículas de quitina que constituyen la preparación de CMP tienen diámetros menores de $10\ \mu\text{m}$;
 - b) un orificio de liberación adaptado para localizarse en la boca o nariz de un paciente; y
 - c) una válvula entre el depósito y el orificio de liberación de tal forma que la válvula pueda accionarse para controlar la liberación de la preparación de micropartículas de quitina.
39. Dispositivo de liberación de la reivindicación 38, donde el dispositivo de liberación es un frasco de pulverización nasal que contiene la preparación de micropartículas de quitina y opcionalmente un vehículo, teniendo el frasco de pulverización un cuello adaptado para la administración nasal.

ES 2 295 391 T3

40. Kit que comprende:

5 (a) una preparación de micropartículas de quitina, donde las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de $10\ \mu\text{m}$ y al menos un 60% de las micropartículas de quitina que constituyen la preparación de CMP tienen diámetros menores de $10\ \mu\text{m}$; y

(b) un alérgeno alimentario;

10 para la administración simultánea o secuencial a un paciente.

41. Kit de acuerdo con la reivindicación 40, donde el alérgeno alimentario es un alérgeno encontrado en la leche, trigo, gluten o huevos.

15 42. Dispositivo o kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, donde las micropartículas de quitina tienen un diámetro medio menor de $5\ \mu\text{m}$.

43. Dispositivo o kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 42, donde las micropartículas de quitina tienen un tamaño medio de al menos $1\ \mu\text{m}$ de diámetro.

20 44. Dispositivo o kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 43, donde las micropartículas de quitina proceden de los exoesqueletos de cangrejos, gambas, langosta, sepia, insectos y hongos.

25 45. Dispositivo o kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 44, donde las micropartículas de quitina se pueden obtener por sonicación o trituración de quitina purificada.

46. Dispositivo o kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 45, donde las micropartículas de quitina son obtenibles recubriendo partículas de vehículos con N-acetil-D-glucosamina, quitina o un fragmento de la misma.

30 47. Dispositivo o kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 46, donde el medicamento se administra a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz comprendida entre 0,01 y 100 mg de compuesto activo por kg de peso corporal.

35 48. Dispositivo o kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 47, donde la preparación de micropartículas de quitina comprende uno o más de un excipiente farmacéuticamente aceptable, un vehículo, un propulsor, un tampón, un estabilizante, un agente para impartir isotonicidad, un conservante o un antioxidante.

40

45

50

55

60

65

Figura 1

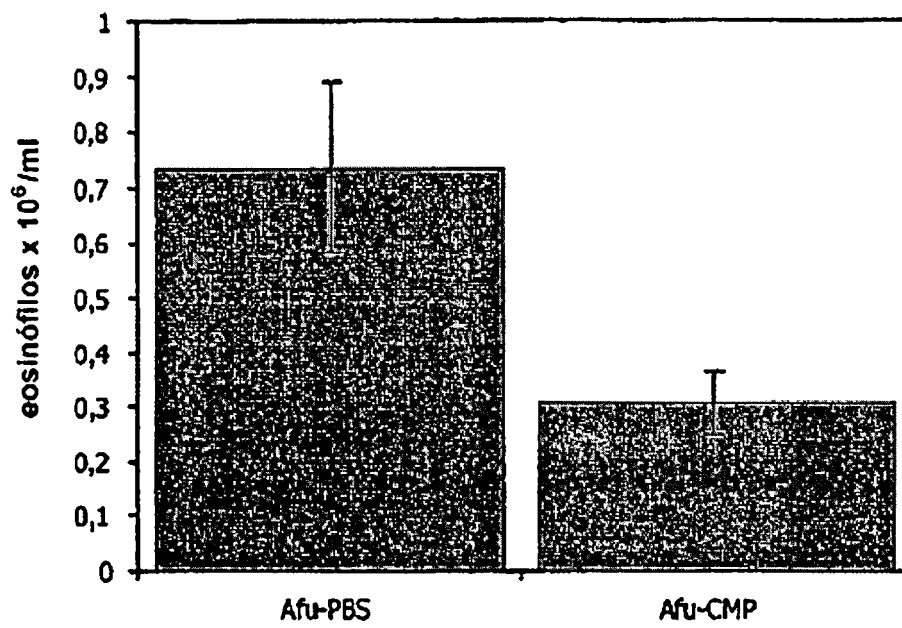


Figura 2

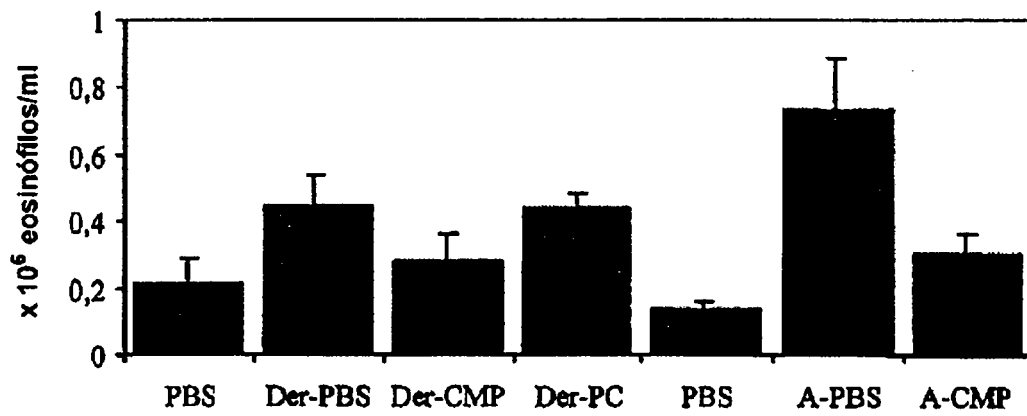


Figura 3

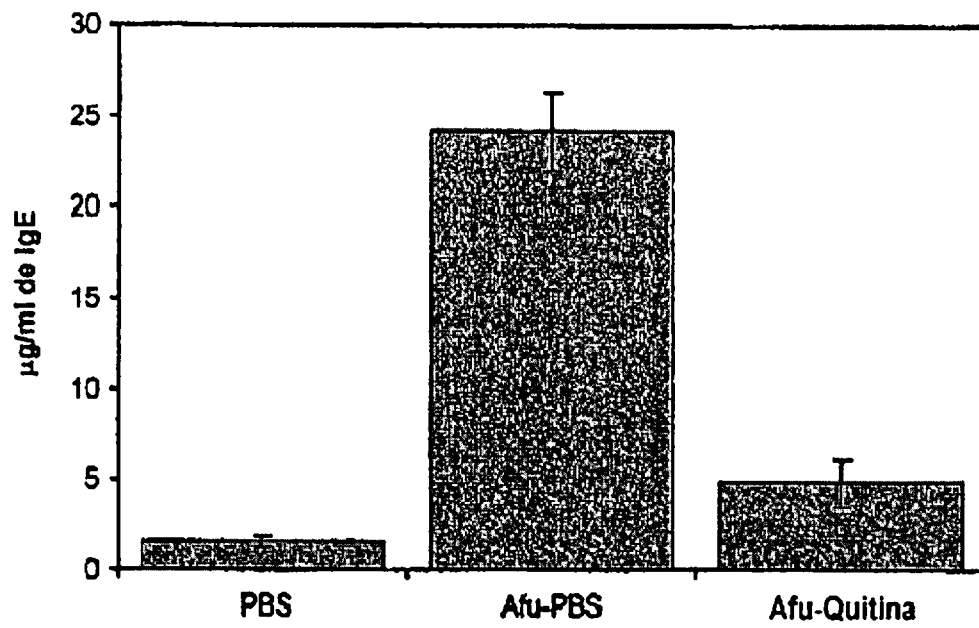


Figura 4

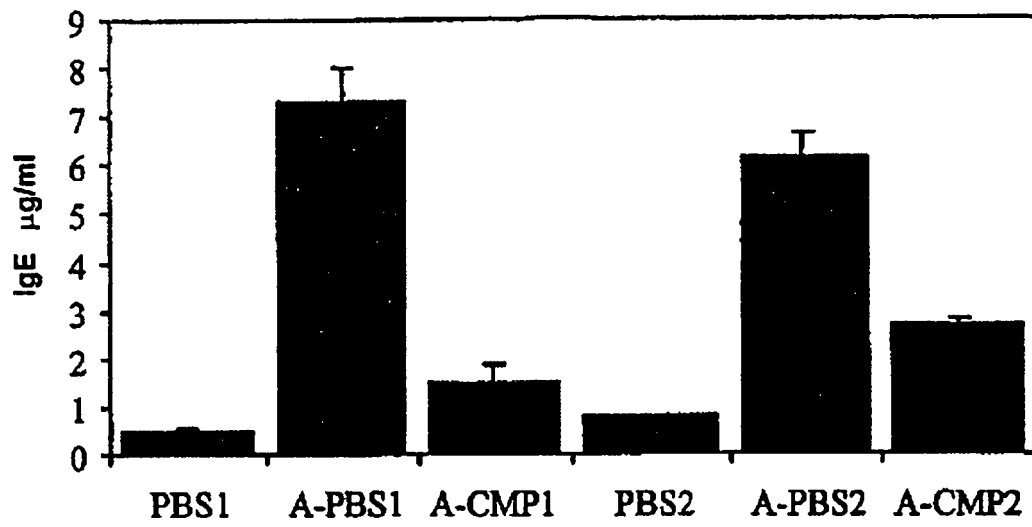


Figura 5

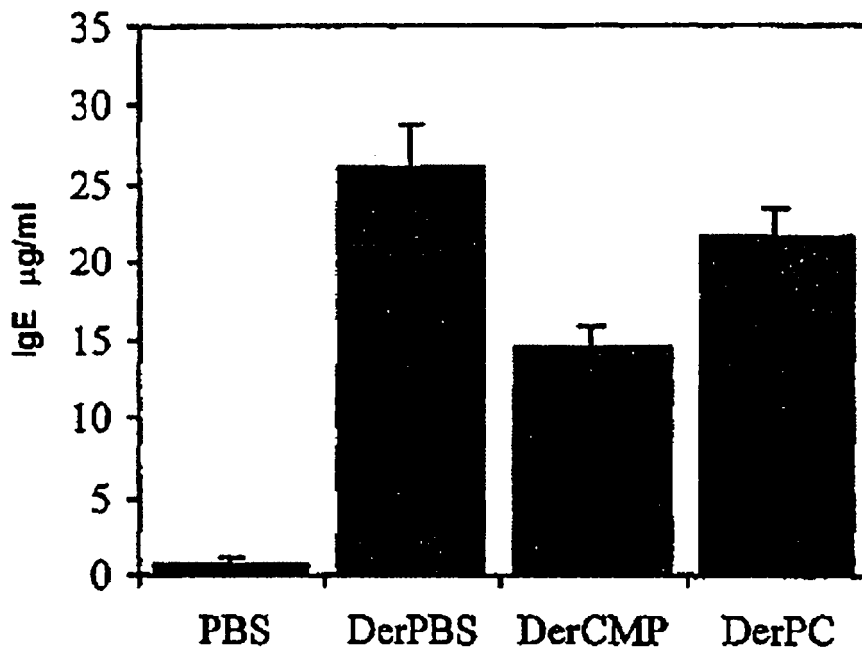


Figura 6

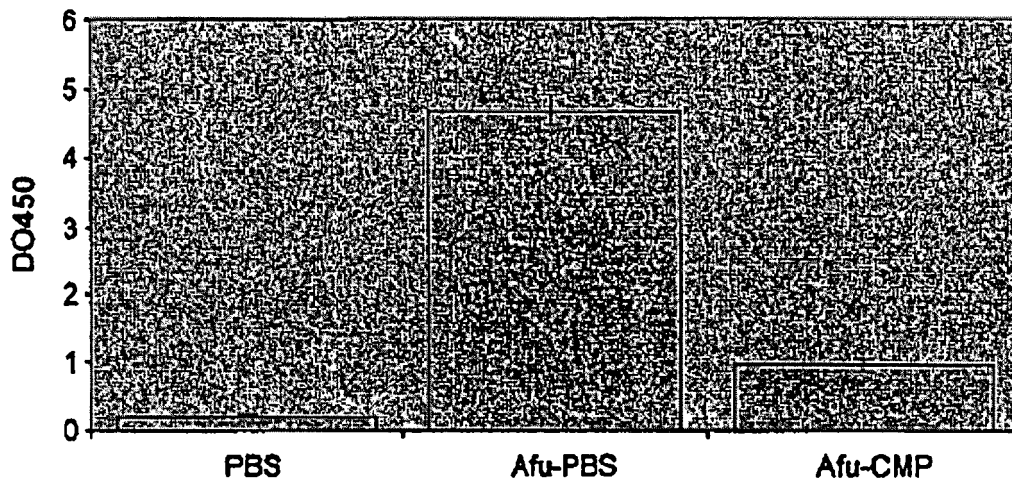


Figura 7

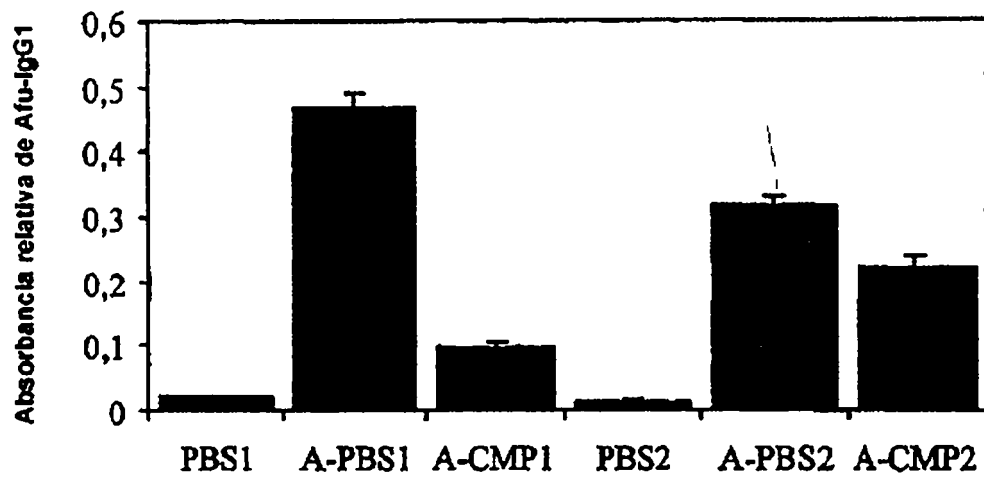


Figura 8

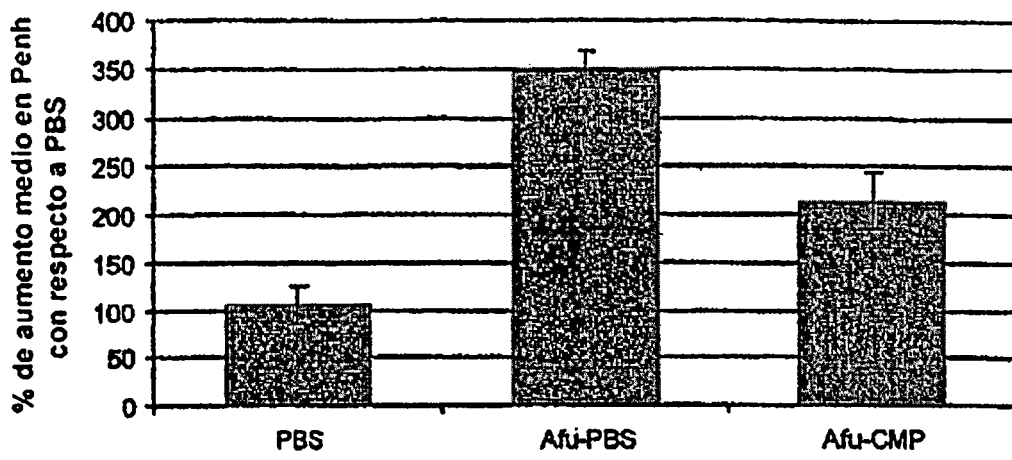


Figura 9

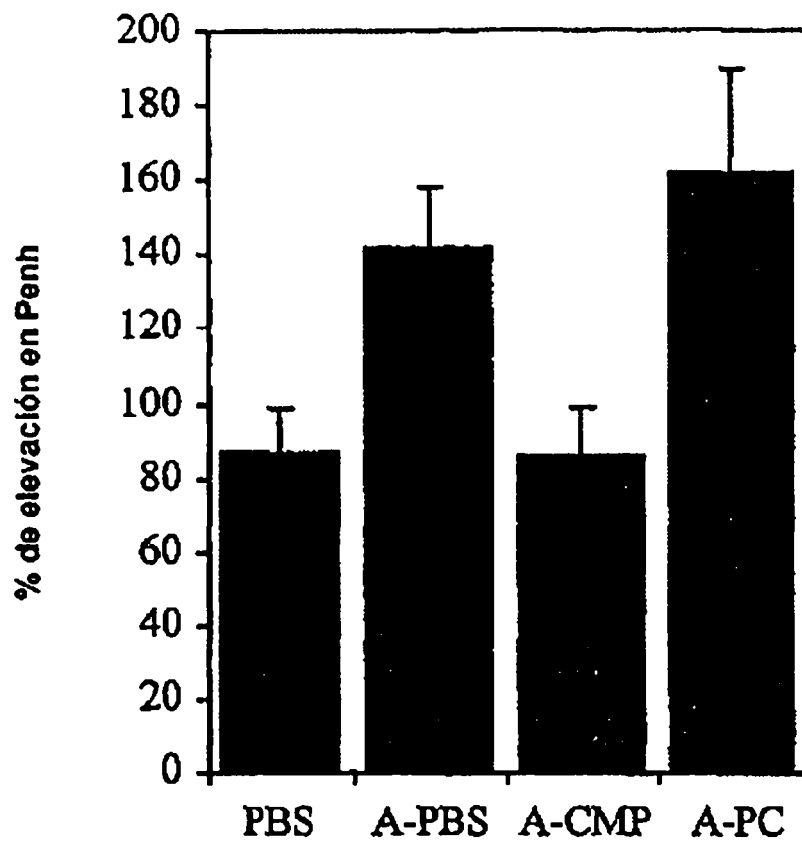


Figura 10

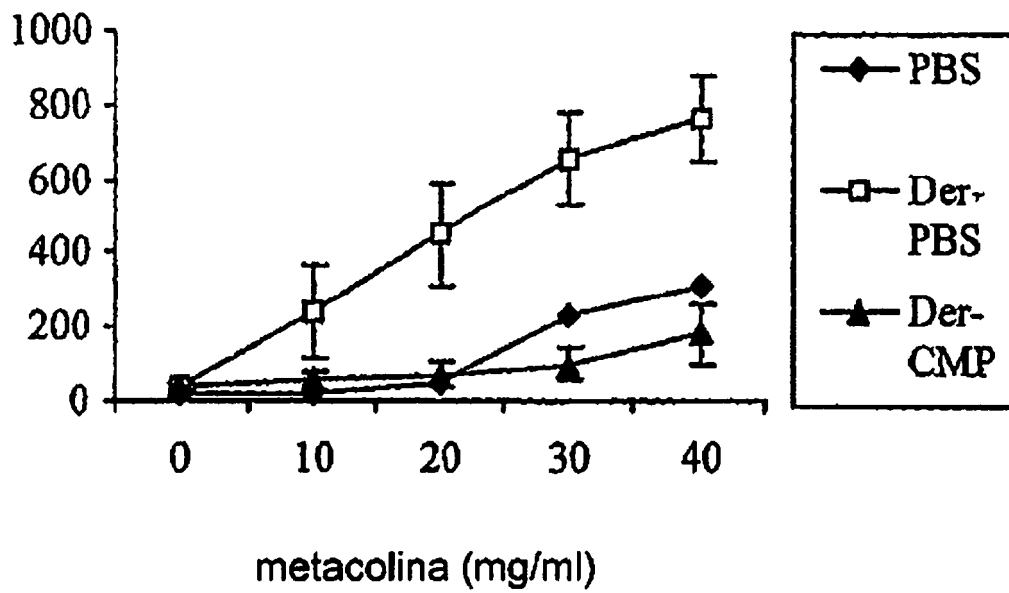


Figura 11

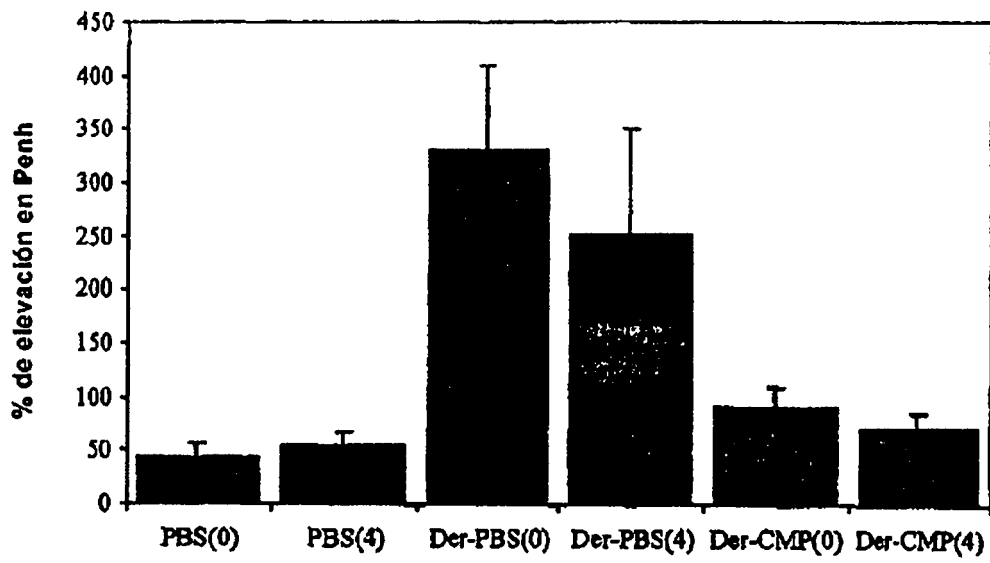


Figura 12

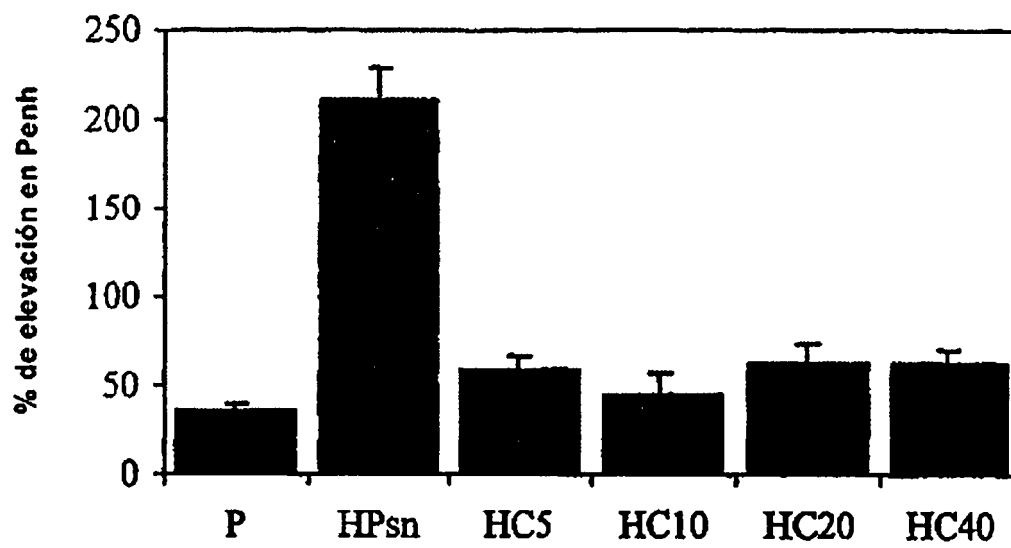


Figura 13

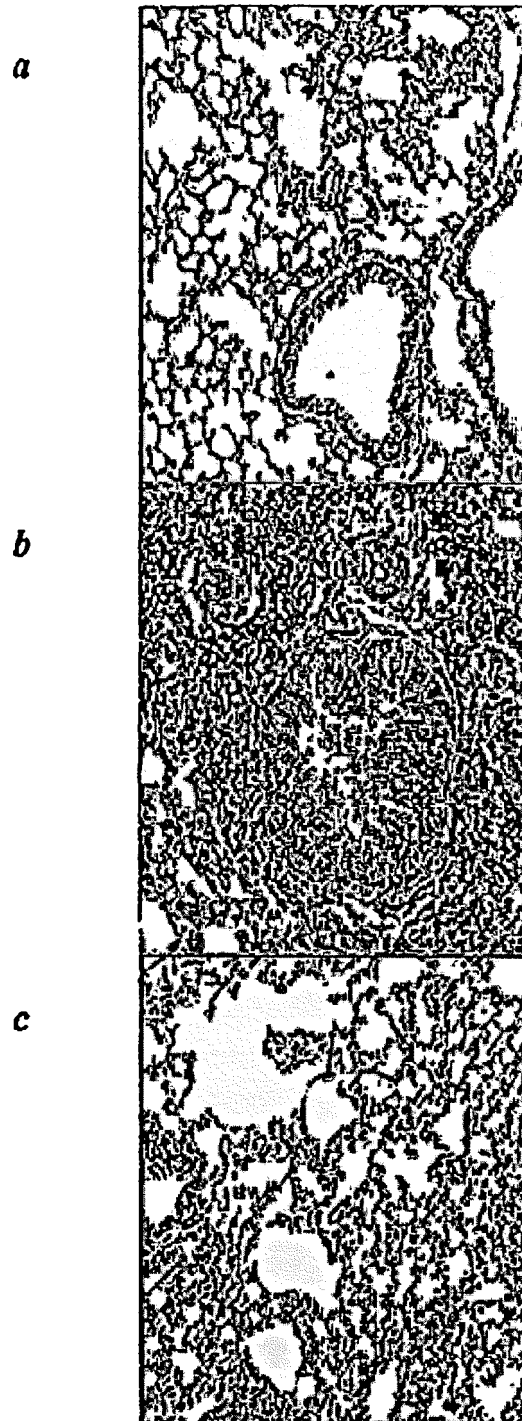


Figura 14

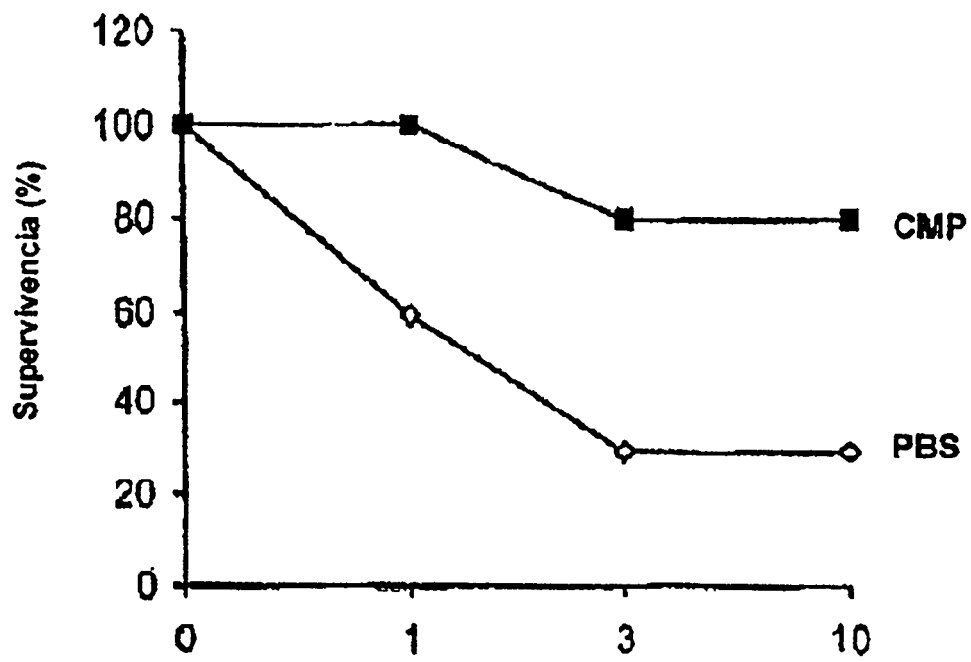


Figura 15

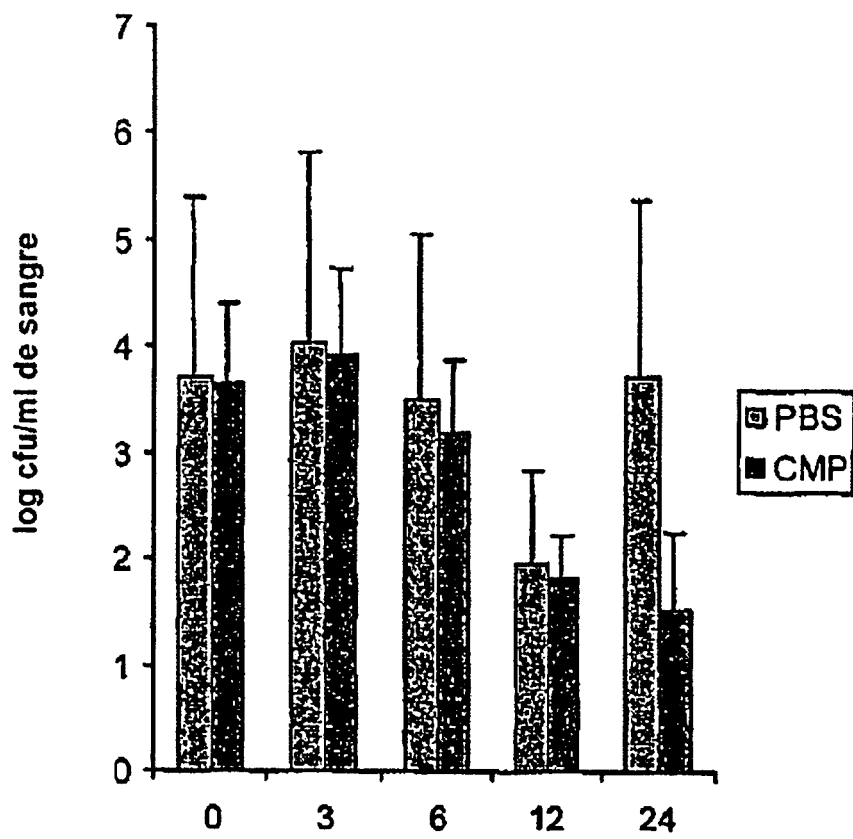


Figura 16

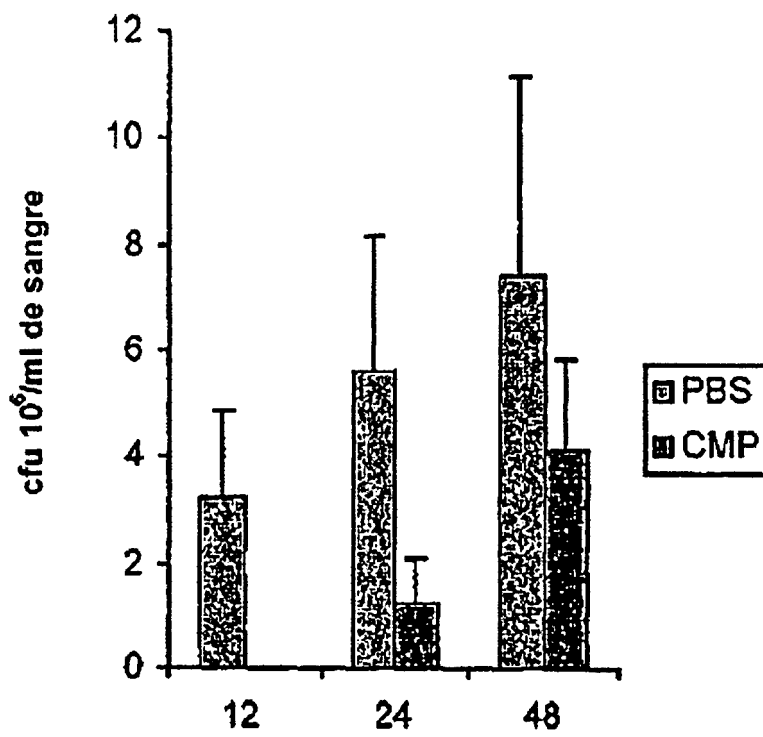


Figura 17

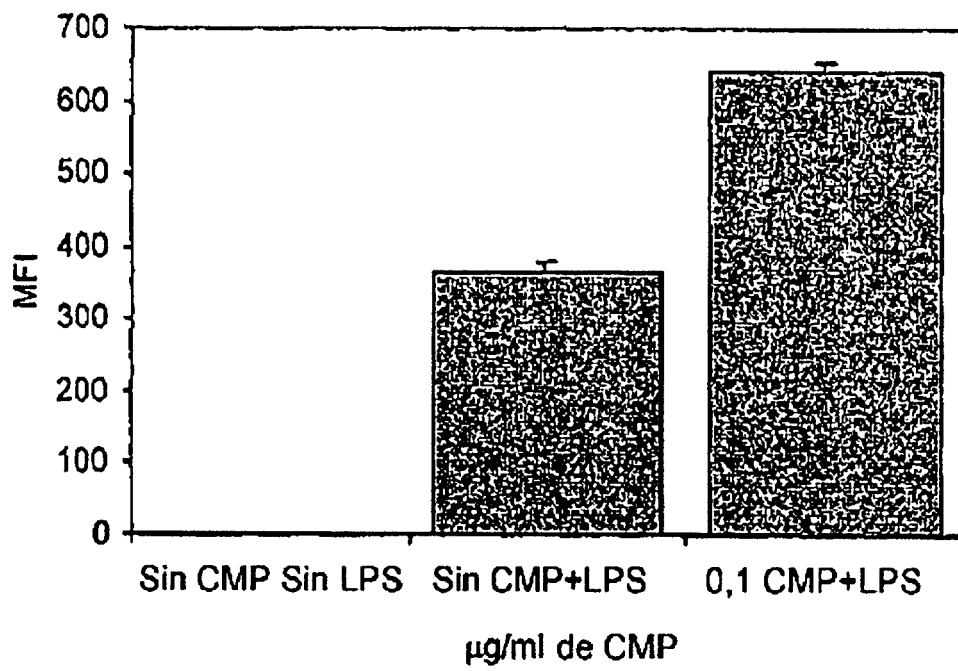


Figura 18

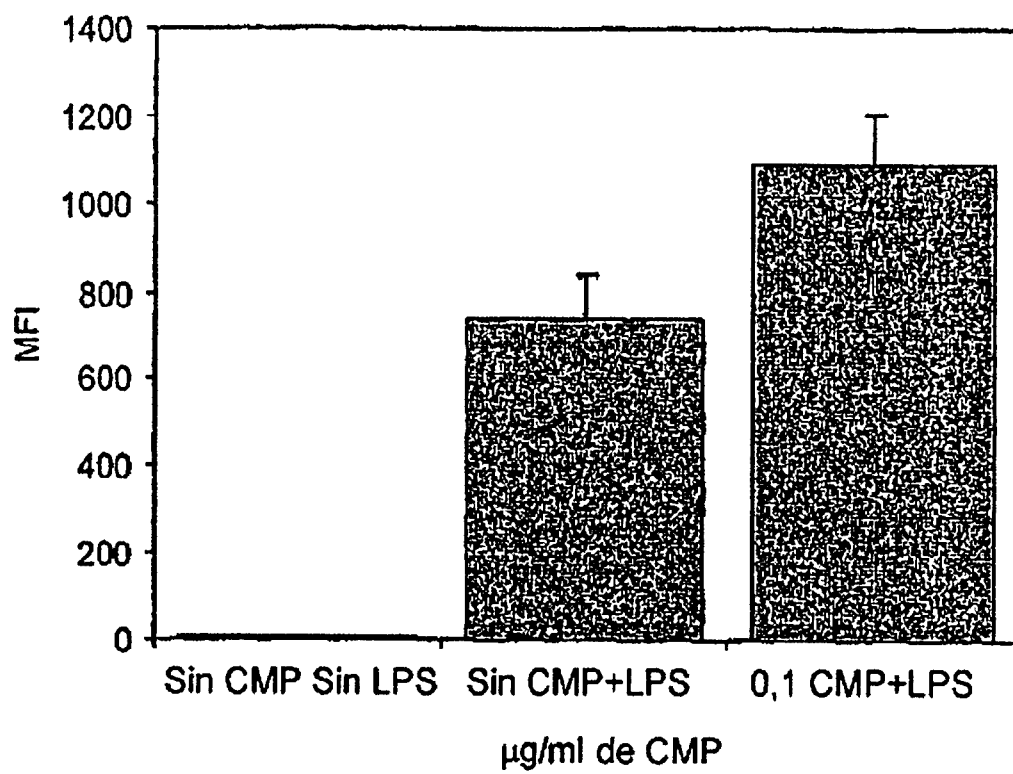


Figura 19

