



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 625**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/38 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99936190 .0**

86 Fecha de presentación : **20.07.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1105505**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2001**

54 Título: **Compuesto y procedimiento para la prevención y/o el tratamiento de la alergia.**

30 Prioridad: **30.07.1998 EP 98870167**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **Leuven Research & Development vzw**
Groot Begijnhof 60/3
3000 Leuven, BE

72 Inventor/es: **Saint-Remy, Jean-Marie y**
Jacquemin, Marc

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Compuesto y procedimiento para la prevención y/o el tratamiento de la alergia.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto y a un nuevo procedimiento para la prevención y/o el tratamiento de la alergia y/o las enfermedades de origen alérgico, particularmente la alergia de hipersensibilidad inmediata.

10 **Antecedentes de la invención**

La hipersensibilidad inmediata es una forma de reacción alérgica que se desarrolla muy rápidamente, es decir después de unos segundos o minutos de exposición del paciente al alérgeno causante. Dicha reacción inmediata puede ir seguida de una segunda reacción de aparición retardada que puede conducir a cambios inflamatorios en el órgano diana y se manifiesta por síntomas crónicos, tales como asma o dermatitis atópica.

La hipersensibilidad inmediata está mediada por anticuerpos que pertenecen principalmente, pero no exclusivamente, al isotipo IgE. Los anticuerpos IgE se unen a receptores específicos en células tales como basófilos, mastocitos o células de Langerhans. En una exposición a alérgenos, el IgE unido a la superficie transduce una señal en la célula, que va seguida de una activación de la célula, que en el caso de los basófilos y mastocitos va acompañada de la liberación de mediadores preformados, tales como histamina y enzimas, y la síntesis de metabolitos de ácido araquidónico. Dichos mediadores son responsables del desarrollo de signos y síntomas alérgicos, tales como broncoespasmo, vasodilatación, hipersecreción de moco y estimulación de terminaciones nerviosas sensoriales que dan como resultado prurito.

Los anticuerpos IgE son producidos por linfocitos B que recibieron señales de activación apropiadas. Se puede encontrar en revistas apropiadas una descripción completa de los mecanismos mediante los cuales se producen anticuerpos IgE (véase por ejemplo Vercelli D., *Allergy Proc.* 14, páginas 413-416 (1993)).

El tratamiento actual de los síntomas alérgicos incluye la evitación de alérgenos, la terapia con fármacos y la inmunoterapia. La evitación completa de la exposición a alérgenos es el método más lógico, pero resulta muy difícil, o imposible de conseguir en una inmensa mayoría de los casos. La terapia con fármacos es útil, pero alivia los síntomas sin influir en sus causas. Además, un tratamiento con fármacos está normalmente limitado por efectos secundarios indeseables.

Los métodos actuales para la inmunoterapia son:

- 1) una hiposensibilización convencional que es un tratamiento que consiste en administrar al paciente dosis progresivamente crecientes del (de los) alérgeno(s) frente a los cuales ha desarrollado una sensibilidad;
- 2) una modificación de los alérgenos que va dirigida a reducir su reconocimiento por los anticuerpos específicos, IgE en particular;
- 3) la utilización de péptidos derivados de alérgenos para interferir en una interacción afín entre células B y T específicas o que contienen un epítipo de células B que se une a IgE.

En la solicitud de patente WO93/08279 se describen dichos péptidos derivados de alérgenos que contienen uno o unos cuantos epítopos de células T utilizados en experimentos en animales y en seres humanos en un intento de inhibir la activación de células T específicas e inducir un estado de incapacidad de respuesta de las células T.

Una aplicación en seres humanos de dicho concepto consiste en la administración de un péptido derivado de la secuencia de epítopos de células T presentes en el alérgeno Fel dI, mediante inyecciones subcutáneas en individuos sensibles a los gatos (Wallner B.P., Gefter M.L., *Allergy* 49, páginas 302-308 (1994)). Se ha utilizado asimismo un método complementario alternativo de dicho concepto en experimentos en animales. Los péptidos utilizados se modifican de tal manera que mantienen la capacidad de unirse a determinantes MHC clase II en células B específicas, pero que han perdido su capacidad de activar las células T correspondientes (O'Hehir R.E. *et al.*, *International Immunology* 3, páginas 819-826 (1991)).

Es conocido que las reacciones alérgicas se generan por la liberación de mediadores procedentes de células diana, tales como basófilos o mastocitos, que presentan receptores superficiales de alta afinidad para IgE, que son ocupados por anticuerpos IgE. El requisito mínimo para que tenga lugar una liberación de mediadores consiste en que dos moléculas de IgE que reconocen el mismo alérgeno se reticulen, que a su vez reticulan el receptor, dando como resultado la transducción de una señal de activación dentro de la célula. Si únicamente una molécula de IgE es capaz de unirse al alérgeno, no tiene lugar ninguna activación de la célula, pero el sitio de unión del IgE quedaría ocupado, impidiendo la activación de la célula en la exposición a un alérgeno nativo. Se ha reivindicado por tanto que la

utilización de un único epítopo que se une a IgE constituye un método adecuado para el tratamiento de enfermedades alérgicas (Ball T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, páginas 28323-28328 (1994), EP-A-0714662).

Estado de la técnica

La patente US nº 4.946.945 describe un conjugado de proteínas útil en inmunoterapia, compuesto por un modificador de respuesta biológica (BRM) y un alérgeno. Dicho conjugado podría combinarse con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se dan a conocer en dicho documento inmunopotenciadores citoquímicos, bacterianos, fúngicos y virales y hormonas del timo como BRM adecuados para su utilización.

La solicitud de patente WO95/31480 describe la preparación y la utilización de un compuesto sintético constituido por dos hélices alfa con disposiciones específicas de diversos aminoácidos. Dicho compuesto se utiliza como soporte para la unión de unidades funcionales, especialmente epítomos de B y/o T.

La solicitud de patente WO95/25424 da a conocer péptidos derivados para utilizar un alérgeno en el tratamiento de la alergia al ácaro de polvo, que inducen incapacidad de respuesta de las células T utilizadas o capacidad de repuesta reducida para individuos sensibles

Definiciones

Se entiende por el término “atopia”, una predisposición parcialmente de origen genético, de un individuo que presenta un sistema inmunitario que produce un exceso de anticuerpos que pertenecen al isotipo IgE en respuesta a una exposición a alérgenos. Los individuos que presentan dichas características se denominan por tanto “individuos atópicos”.

Un “alérgeno” se define como una sustancia, normalmente una macromolécula de composición proteínica que activa la producción de anticuerpos IgE en individuos predispuestos, preferentemente genéticamente dispuestos (atópicos).

Se presentan definiciones similares en las siguientes referencias: *Clin. Exp. Allergy*, nº 26, páginas 494-516 (1996); *Mol. Biol. of Allergy and Immunology*, ed. R. Bush, *Immunology and Allergy Clinics of North American Series* (agosto de 1996).

Dichos alérgenos son preferentemente los alérgenos principales que se seleccionan de entre el grupo constituido por:

- alérgenos de alimentos presentes en cacahuetes, bacalao, clara de huevo, soja, camarones, leche y trigo,
- alérgenos de ácaros de polvo doméstico obtenidos a partir de *Dermatophagoides spp. pteronyssinus, farinae* y *microceras*, *Euroglyphus maynei* ó *Blomia*,
- alérgenos procedentes de insectos, presentes en cucarachas o himenópteros,
- alérgenos procedentes de polen, especialmente pólenes de árboles, hierbas y malas hierbas,
- alérgenos presentes en animales, especialmente en gatos, perros, caballos y roedores,
- alérgenos presentes en hongos, especialmente procedentes de *Aspergillus*, *Alternaria* ó *Cladosporium*, y
- alérgenos ocupacionales presentes en tales productos como látex, amilasa, etc.

Dichos alérgenos pueden ser asimismo alérgenos principales presentes en mohos o diversos fármacos, tales como hormonas, antibióticos, enzimas, etc.

La “alergia” es el conjunto de signos y síntomas que se observan siempre que un individuo atópico se encuentra con un alérgeno frente al cual ha sido sensibilizado, lo cual puede dar como resultado el desarrollo de diversas enfermedades y síntomas, tales como rinitis alérgica, asma bronquial, dermatitis atópica, etc.

La “hipersensibilidad” es una reacción adversa producida en un individuo susceptible en la exposición a un antígeno frente al cual se ha vuelto sensible; la hipersensibilidad inmediata depende de la producción de anticuerpos IgE y es por tanto sinónima de alergia.

Se entiende por el término “epítopo” o la expresión “determinante antigénico”, una o varias porciones (que pueden definir un epítopo conformacional) de un antígeno (estructura de una macromolécula, incluyendo un alérgeno, preferentemente constituido por una composición proteínica pero asimismo constituido por uno o más haptenos o porción de un compuesto farmacéuticamente activo) que son específicamente reconocidos y unidos a un anticuerpo o un receptor de la superficie celular de un linfocito B ó T.

Sumario de la invención

El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una estrategia de vacunación mediante la cual la respuesta de anticuerpos producida por individuos atópicos contra alergenitos se desvía de los determinantes principales de alergenitos que son reconocidos espontáneamente por individuos atópicos, a determinantes en la misma molécula que son reconocidos espontáneamente por anticuerpos de individuos no atópicos, o a determinantes que no son reconocidos espontáneamente por la mayoría de los individuos, independientemente de su estado atópico.

La presente invención se refiere a un compuesto para la prevención y/o el tratamiento de la alergia al ácaro de polvo que comprende:

- por lo menos un determinante antigénico de alergenito del ácaro de polvo que es reconocido por una célula B o un anticuerpo secretado por una célula B de un individuo no atópico a dicho alergenito, y por lo menos un determinante antigénico de un antígeno diferente de dicho alergenito, dando lugar a la activación de células T,

en el que dicho compuesto se selecciona de entre el grupo constituido por los péptidos que presentan las secuencias siguientes:

- SEC ID N° 1: QYIKANSKFIGITELGGHEIKKVLVPGCHGS

- SEC ID N° 3:

DQYIKANSKFIGITELGGQYIKANSKFIGITELSSCHGSEPCI IHRGKP
 FGGCHGSEPCI IHRGKPFSSCHGSEPCI IHRGKPFGGCHGSEPCI IHRG
 KPFSSCHGSEPCI IHRGKPFGGCHGSEPCI IHRGKPFSSR

- SEC ID N° 4:

PKYVKQNTLKLATGKKGPKYVKQNTLKLATGKKGVIIGIK

- SEC ID N° 5:

QYIKANSKFIGITELGGCHGSEPCNIHRGKPF

- o una secuencia nucleotídica que codifica por lo menos una de dichas secuencias de aminoácidos,
- o la secuencia nucleotídica SEC ID N° 6:

GAATTCACCATGGATCAGTATATAAAAGCAAATTCTAAATTT
 ATAGGTATAACTGAACTAGGAGGTTGCCATGGTTCAGAACCATGTATCATTATCGT
 GGTAACCATTCGGCGGTTGTCACGGAAGTGAGCCTTGCAATTATACACAGAGGAAAG
 CCGTTCTAAGCGGCCGC.

Los determinantes antigénicos de alergenitos específicos presentes en conocidos alergenitos principales son identificados fácilmente por el experto en la materia, quien puede seleccionar dichos epítopos o determinantes antigénicos de dicho alergenito que son reconocidos por individuos no atópicos (individuos no atópicos a dicho alergenito) y que pueden ser diferentes de los otros epítopos para los que los individuos atópicos producen anticuerpos, como se ha descrito anteriormente. De manera similar, el experto en la materia puede seleccionar el determinante antigénico específico de cualquier antígeno (diferente de dicho alergenito) que es conocido que da lugar a la activación de células T. Preferentemente, dicho antígeno no es un alergenito.

El compuesto según la presente invención producirá en pacientes atópicos una desviación de la respuesta inmunitaria antialergenito hacia epítopos o determinantes antigénicos que no son reconocidos espontáneamente o lo son sólo mínimamente por anticuerpos de pacientes atópicos.

En el compuesto según la presente invención, el determinante antigénico de alérgeno y el determinante antigénico del antígeno no alérgico son preferentemente secuencias peptídicas químicamente unidas entre sí (en forma de un tándem lineal o en forma ramificada), preferentemente mediante un engarce peptídico, que está constituido preferentemente por al menos dos aminoácidos. El compuesto según la presente invención se encuentra en una forma lineal o cíclica, con o sin restos adicionales utilizados, por ejemplo, para bloquear interacciones péptido-péptido.

Ventajosamente, en el compuesto según la presente invención, el determinante antigénico de un antígeno que da lugar a la activación de células T es un epítipo de células T (preferentemente un epítipo de células T cooperadora) de toxoide tetánico, difteria, micobacteria, antígenos del virus de la influenza o el sarampión (en la tabla II del documento WO95/26365 se describen otros ejemplos de dichos epítopos de células T).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, cosmética, de alimento y/o de pienso que comprende el compuesto según la invención y un excipiente aceptable farmacéutico, cosmético, de alimentos y/o de piensos.

Preferentemente, dicha composición farmacéutica consiste en una vacuna que puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable que puede consistir en cualquier sustancia no tóxica compatible adecuada para administrar la composición (vacuna) según la presente invención a un paciente y obtener las deseadas propiedades terapéuticas o profilácticas. Los excipientes farmacéuticamente aceptables según la presente invención, adecuados para una administración oral, son los bien conocidos por el experto en la materia, tales como comprimidos, píldoras revestidas o no revestidas, cápsulas, soluciones o jarabes. Otros excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados pueden variar según el modo de administración (cutánea, epicutánea, subcutánea, intradérmica, por inhalación, por parches, intravenosa, intramuscular, parenteral, oral, etc.).

Cuando el compuesto según la presente invención consiste en una secuencia nucleotídica, el compuesto según la invención se puede administrar puro o en un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un "vector" utilizado para la transfección, transducción y expresión de dicha secuencia por una célula del paciente (incluyendo la expresión y la secreción fuera de la célula de la secuencia peptídica codificada por dicha secuencia nucleotídica). Dicho "vector" se selecciona preferentemente de entre el grupo constituido por plásmidos, virus, (retrovirus, adenovirus, ...), vectores lipídicos (tales como vesículas catiónicas, liposomas, etc.), moléculas o dispositivos que dan como resultado una modificación química o física de la célula transfectada (fosfato de dextrano, fosfato de calcio, un dispositivo de microinyección, un dispositivo de electroporación, etc.) u organismos recombinantes modificados que comprenden el compuesto según la presente invención derivado, por ejemplo, de cepas de *Salmonella* o *Mycobacteria*, un ácido nucleico encapsulado en forma de micro- o nanopartículas, tales como quitosano, tal como se describe por Roy *et al.*, *Nature Medicine* 5, páginas 387-391 (1999), etc.

La modificación genética de la(s) célula(s) del paciente para un tratamiento *ex vivo* o *in vivo* se puede obtener por el experto en la materia según los procedimientos conocidos en el campo de la terapia genética (tales como el que se describe en los documentos WO91/02805, WO91/18088 y WO91/15501).

La composición farmacéutica o la vacuna según la presente invención puede comprender asimismo adyuvantes (incluyendo virus cooperadores) bien conocidos por el experto en la materia, que pueden modular la respuesta humoral, local, mucosal y/o celular del sistema inmunitario de un paciente y mejorar la utilización del compuesto según la presente invención.

Los adyuvantes pueden encontrarse en diferentes formas, siempre que sean adecuadas para su administración a seres humanos. Ejemplos de dichos adyuvantes son emulsiones en aceite de origen mineral o vegetal; compuestos minerales tales como fosfato o hidróxido de aluminio, o fosfato de calcio; productos bacterianos y derivados, tales como P40 (derivado de la pared celular de *Corynebacterium granulosum*), lípido monofosforílico A (MPL, derivado de LPS) y derivados muramilo-peptídicos y conjugados de los mismos (derivados de componentes de micobacterias), alumbre, adyuvante de Freund incompleto, liposina, saponina, escualeno, etc. Se describen recientes revisiones sobre adyuvantes para una administración a seres humanos por Gupta R.K. *et al.* (*Vaccine* 11, páginas 293-306 (1993)) y por Johnson A.G. (*Clin. Microbiol. Rev.* 7, páginas 277-289 (1994)).

La composición farmacéutica según la presente invención se prepara mediante los procedimientos generalmente aplicados por el experto en la materia para la preparación de diversas composiciones farmacéuticas, especialmente vacunas, en las que la proporción de compuesto activo/excipiente farmacéuticamente aceptable puede estar comprendida en intervalos muy grandes (generalmente una forma unitaria de dosificación adecuada contiene de aproximadamente 0,005 µg a aproximadamente 1 mg del compuesto por kg/peso corporal del paciente), limitada únicamente por la tolerancia y el nivel de aceptación del paciente al compuesto. Los límites son determinados particularmente por la frecuencia de administración y por las enfermedades y síntomas específicos que se han de tratar.

Preferentemente, el compuesto está presente en la composición farmacéutica en una concentración que permite por lo menos la reducción o supresión de los signos y síntomas de alergia o de una enfermedad de origen alérgico (preferentemente signos y síntomas de alergia de hipersensibilidad inmediata).

La composición cosmética según la presente invención puede comprender cualquier excipiente cosmético aceptable seleccionado según el modo específico de administración. Por ejemplo, para higiene de la piel, la composición cosmética podría consistir en un producto en forma de una crema, una pomada o un bálsamo.

5 La composición de alimento o de pienso según la presente invención podría ser cualquier excipiente aceptable para alimentos, piensos o bebidas que comprende los componentes normales de líquidos, alimentos o piensos en los que se incluye el compuesto según la invención.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización del compuesto según la invención como medicamento.

La presente invención se refiere asimismo a la utilización del compuesto según la invención o la composición farmacéutica según la invención para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de prevención y/o tratamiento de la alergia o de una enfermedad de origen alérgico, particularmente la alergia de hipersensibilidad inmediata, que comprende la etapa que consiste en administrar el compuesto o la composición farmacéutica según la invención a un paciente, preferentemente un paciente humano, especialmente un individuo atópico a un alérgeno, con el fin de dar lugar o aumentar ventajosamente la producción de anticuerpos hacia determinantes antigénicos del alérgeno que no son reconocidos espontáneamente o lo son sólo mínimamente por el sistema inmunitario de individuos atópicos.

20 Estas enfermedades que comprenden rinitis y sinusitis de origen alérgico, asma bronquial, dermatitis atópica, algunas formas de urticaria aguda y crónica, síndromes gastrointestinales asociados con la ingestión de alérgenos de alimentos, tales como β -lactoglobulina, el denominado síndrome orofaríngeo del mismo origen y reacciones anafiláticas asociadas con una hipersensibilidad a fármacos.

La presente invención se describirá en los ejemplos siguientes, haciendo referencia a las figuras adjuntas. Dichos ejemplos se presentan como ilustraciones no limitativas de las diversas formas de realización de la presente invención.

30 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa ratones Balb/c inmunizados mediante dos inyecciones subcutáneas de rDer pII (10 μ g en adyuvante de Freund) administradas en un intervalo de 2 semanas. Se sangraron los ratones y se evaluó la reactividad de los anticuerpos utilizando una serie de péptidos con solapamiento que cubren la secuencia de Der pII o el adyuvante de células T (FIS). Los ratones que reconocían el péptido 11 (obsérvese el punto 2 de la Figura) se inmunizaron además dos veces con 10 μ g del péptido 21 y mostraron que reconocían entonces el péptido 21 con una reducción del 50% de la concentración de anticuerpos para el péptido 11 (punto 3 de la Figura). Una administración adicional de rDer pII mantiene la reactividad para el péptido 21, mientras que se reduce además la concentración de anticuerpos para el

40 péptido 11 (punto 4).
La Figura 2 representa un péptido marcado con biotina diluido en una solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (PBS) a una concentración de 2 μ g/ml. Se añaden cincuenta μ l de dicha dilución a placas revestidas con neutravidina y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavan con PBS y se saturan los sitios de unión residuales mediante la adición de 100 μ l de caseína diluida en 5 mg/ml en PBS. Después de 30 minutos a TA, la placa se lava de nuevo y se incubaba durante 2 h a TA con una dilución 1/5 de suero procedente de un individuo atópico, se lava de nuevo y se incubaba con anticuerpos de cabra específicos para IgE humano que se acoplan a peroxidasa. Después de un nuevo lavado, la placa se incubaba con un sustrato para la enzima que se colorea después de una escisión enzimática. La intensidad de la coloración en los pocillos (que se muestra por absorbancia a 490 nm en el eje Y) es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgE específicos presentes en la muestra de suero. Los ensayos testigos incluyeron la dilución sin péptidos o sin anticuerpos.

55 La Figura 3 representa un ensayo llevado a cabo como se describe en la explicación de la Figura 2, excepto en la utilización de una dilución 1/100 de suero obtenido a partir de sujetos no atópicos y la utilización de anticuerpos de cabra para IgG humano.

La Figura 4 representa un ensayo llevado a cabo exactamente como se describe para la Figura 3, excepto en la utilización de suero obtenido a partir de sujetos atópicos.

60 Figura 5 Se recogen veinticinco ml de sangre mediante una punción venosa en un tubo heparinizado y se diluyen dos veces con medio RPMI y se depositan sobre un gradiente de densidades Ficoll-Hypaque. Los tubos se centrifugan durante 20 min a 1.000 g. Se recogen células de la interfase por aspiración y se vuelven a suspender en RPMI, se lavan dos veces con el mismo medio y se vuelven a suspender finalmente en el mismo medio a razón de 10^6 células/ml. Se añaden cincuenta μ l que contienen 10 μ g/ml del péptido 11-22 ó el 22-33 diluidos en el medio para una incubación de 6 días a una temperatura de 37°C. Se añade un testigo positivo con PHA (10 μ g/ml). Se determina la proliferación de células T comprobando el grado de incorporación de bromo-uridina (BrdU) en ADN de las células, utilizando un anticuerpo específico para BrdU. Los resultados se muestran en la absorbancia a 490 nm. No se puede observar ninguna proliferación de células T por encima del valor de base con el péptido 11-22.

Descripción detallada de la invención

Los sujetos atópicos así como los no atópicos producen anticuerpos contra alergen medioambientales. Dichos anticuerpos pertenecen a todos los isotipos que se han descrito hasta la fecha, incluyendo IgE (Saint-Remy J.M.R. *et al.*, *J. Immunol.* 43, páginas 338-347 (1988)). Se observa normalmente que los individuos atópicos producen de 10 a 100 veces más anticuerpos IgE que los individuos no atópicos, lo cual puede explicar por lo menos parcialmente la razón por la que los individuos atópicos padecen de síntomas cuando se encuentran con alergen frente a los cuales están sensibilizados.

Se ha descubierto inesperadamente que los determinantes antigénicos de alergen tales como *Der pI* y *Der pII* - dos de los principales alergen del ácaro de polvo doméstico *Dermatophagoides pteronyssinus* - que son reconocidos por anticuerpos de atópicos no son idénticos a los reconocidos por individuos no atópicos. Esta conclusión se alcanzó utilizando una serie de anticuerpos monoclonales producidos en ratones contra moléculas de *Der pI* ó *Der pII* purificadas. En un inmunoensayo de competición, los presentes inventores han determinado que algunos de los determinantes antigénicos son reconocidos por anticuerpos antialergen procedentes de individuos atópicos, mientras que otros determinantes son reconocidos por anticuerpos antialergen producidos por no atópicos. Además, ellos han mostrado que pacientes atópicos cuyos síntomas alérgicos mejoraron, ya sea espontáneamente o como resultado de un tratamiento, comenzaron produciendo anticuerpos para los mismos determinantes reconocidos por individuos no atópicos, mientras que se reducía la producción de anticuerpos iniciales.

La invención se refiere a la utilización de péptidos derivados de regiones de moléculas de alergen que son reconocidas por anticuerpos producidos por no atópicos, o posiblemente de regiones que no producen una respuesta espontánea de anticuerpos. Una administración de dichos péptidos a individuos atópicos da como resultado la producción de anticuerpos específicos. Dichos anticuerpos se unirán a los alergen siempre que los pacientes se expongan de modo natural a ellos y, como consecuencia de ello, restringirán el acceso de anticuerpos producidos espontáneamente por los pacientes. Algunos pacientes atópicos producen adicionalmente una pequeña proporción de anticuerpos para determinantes antigénicos reconocidos por individuos no atópicos. En tales casos, una administración de dichos péptidos aumentará la proporción de dichos anticuerpos con el fin de hacerlos predominantes en la respuesta inmunitaria antialergen.

Por tanto el objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento mediante el cual la respuesta inmunitaria antialergen se desvía hacia epítomos que no son reconocidos espontáneamente o lo son sólo mínimamente, por anticuerpos producidos por pacientes atópicos.

El procedimiento de inmunización que es el objeto de la presente invención proporciona diversas ventajas sobre otros procedimientos.

En primer lugar, el procedimiento de inmunización según la presente invención es seguro, ya que los péptidos utilizados no llevan determinantes que pueden ser reconocidos por anticuerpos IgE y no presentan por tanto ninguna capacidad de inducir una reacción anafiláctica. Dicha propiedad contrasta con procedimientos de administración que utilizan moléculas de alergen enteras en sus formas nativa o modificada.

En segundo lugar, la cantidad de material inmunizante y el número de inyecciones requeridas según la invención son mucho más reducidos en comparación con estrategias inmunoterapéuticas alternativas, por la siguientes razones:

- (1) como los péptidos producidos mediante la presente invención no contienen determinantes que se unen a IgE, se puede proporcionar de una vez una dosis inmunogénica de péptido, que por tanto acorta de forma apreciable el periodo de tiempo del tratamiento. Una mezcla o administración simultánea de un adyuvante puede aumentar la inmunogenicidad de los péptidos, reduciendo además el número de inyecciones (y la cantidad de material requerido) a posiblemente una sola;
- (2) como los individuos atópicos pueden producir en realidad una pequeña cantidad de anticuerpos dirigidos a los epítomos reconocidos por individuos no atópicos, una inyección de péptidos obtenidos mediante la presente invención promueve por tanto una respuesta inmunitaria secundaria (una respuesta inmunitaria secundaria dará como resultado la producción de títulos de anticuerpo mucho más elevados que una respuesta inmunitaria primaria);
- (3) como la administración de péptidos modifica la respuesta inmunitaria a alergen en una etapa temprana, es decir, el reconocimiento de alergen, el procesado mediante células que presentan antígenos y la presentación a células T, una cantidad limitada de material será todo lo que se necesita para conseguir el objetivo de la presente invención.

Las características descritas anteriormente representan una ventaja concreta sobre una desensibilización convencional que ha de administrarse durante varios meses o años y que hace uso de una cantidad elevada de alergen. En terapias alternativas, tales como la utilización de péptidos para anergizar células T, la terapia requiere cantidades mucho más elevadas de péptidos libres para compensar el elevado régimen de catabolismo de péptidos, y se necesita una administración repetida para mantener el estado anergético.

En tercer lugar, una exposición continuada a los alérgenos presentes en el medio ambiente natural de pacientes tratados mediante la presente invención es suficiente para mantener la respuesta inmunitaria hacia los determinantes antigénicos que corresponden a péptidos utilizados para la inmunización. Hay disponible en realidad una evidencia experimental que muestra que ratones inmunizados con un péptido derivado de un antígeno mantienen su reactividad hacia el péptido después de una inoculación posterior con el antígeno entero (fenómeno de dominancia clonal) (Benjamini E. *et al.*, *J. Immunol.* 141, páginas 55-63 (1988) y Schutze M.P. *et al.*, *J. Immunol.* 142, páginas 2635-2640 (1989)) y la figura 1 adjunta).

El procedimiento según la presente invención representa asimismo una clara ventaja sobre otras terapias mediante las cuales se busca una tolerancia a alérgenos en lugar de una inmunización hacia nuevos determinantes antigénicos. En el primer caso, se requiere una administración repetida de tolerógenos para mantener el estado de falta de capacidad de respuesta.

El modo preciso de acción de la presente invención no está aún completamente aclarado.

Es elevado el número de posibles determinantes antigénicos que pueden ser reconocidos por anticuerpos en alérgenos. Sin embargo, los alérgenos son normalmente pequeñas moléculas, lo cual restringe el número de moléculas de anticuerpo que pueden unirse a alérgenos al mismo tiempo. Los anticuerpos que están presentes a la concentración más elevada y/o que presentan la afinidad más elevada se unirán preferentemente al alérgeno. Lo mismo resulta cierto para células B específicas, que expresan en su membrana superficial una molécula de inmunoglobulina idéntica a la que secretan. Un antígeno será capturado por tanto por células B que presentan la afinidad más elevada y/o la frecuencia más elevada. Esto impedirá la activación de células B que reconocen otros epítomos en la misma molécula, un fenómeno que se denomina el "fenómeno de dominancia clonal" (Schutze M.P. *et al.* *J. Immunol.* 142, páginas 2635-2640 (1989)).

Si se induce una respuesta inmunitaria preferente en individuos atópicos hacia epítomos que no son reconocidos o lo son sólo débilmente por anticuerpos formados espontáneamente, el fenómeno de dominancia clonal indica que la respuesta inmunitaria antialérgenos se dirigirá entonces a dichos nuevos determinantes y se reducirá para determinantes antigénicos inicialmente reconocidos. Dos líneas de evidencia experimental respaldan este concepto. En primer lugar, la eliminación de un epítomo de células B inmunodominante en un antígeno descubre epítomos que no eran reconocidos en el antígeno intacto y hacia los cuales va entonces dirigida la respuesta del anticuerpo (Scheerlinck J.P.Y. *et al.*, *Mol. Immunol.* 30, páginas 733-739 (1993)). En segundo lugar, los ratones inmunizados con un antígeno utilizan únicamente una fracción de su repertorio potencial de células B para montar una respuesta inmunitaria específica; la inmunización con un péptido activa un repertorio seleccionado de células B, cuya reactividad se mantendrá incluso si al animal se le inyecta más tarde el antígeno nativo (Benjamini E. *et al.*, *J. Immunol.* 141, páginas 55-63 (1988)).

Dichas dos series de experimentos ilustran lo que está sucediendo como consecuencia de la administración del compuesto según la presente invención. Como respaldo adicional al concepto de dominancia clonal y su aplicación a la alergia, a ratones Balb/c se les inyectó un alérgeno recombinante (r), Der pII. La especificidad precisa de los anticuerpos producidos por dichos ratones se determinó mediante reacción con un panel de péptidos 15-mer que cubrían la secuencia completa de Der pII con un solape de 5 aminoácidos.

En el ejemplo que se muestra en la Figura 1, los ratones están produciendo anticuerpos para rDer pII y para el péptido 11-25. Una inmunización adicional con péptido 21-35 induce una respuesta inmunitaria a 21-35 y una reducción importante de la unión al péptido 11-25. La respuesta inmunitaria a Der pII se desvía por tanto hacia determinantes que no eran reconocidos en primer lugar. Además, dicho experimento muestra que la respuesta inmunitaria inducida "desviada" resiste una inmunización adicional con el alérgeno entero rDer pII.

Para ser totalmente eficaz, sin embargo, el péptido que lleva un epítomo de células B ha de administrarse junto con un epítomo que puede ser reconocido por células T, que proporcionará a las células B las señales necesarias para permitir una total diferenciación en plasmocitos maduros, productores de anticuerpos. El epítomo de células T no tiene que derivarse de la misma molécula que la célula B. Por tanto, un heteropéptido que contiene un epítomo de células B derivado de un alérgeno dado y un epítomo de células T de otro origen mantendrán la especificidad requerida a nivel de la célula B, mientras que se asegura que estén presentes las señales necesarias proporcionadas por células T. Entre dichas señales se incluyen el reconocimiento de células B-T afines y señales no específicas de antígenos, tales como la producción de interleuquina, la interacción de CD40 con su ligando, la interacción de B7 (CD80) con CD28 (Austyn & Wood, *Principles of Cellular and Molecular Immunology*, Oxford University Press (1993)).

El epítomo (o epítomos) de células T utilizado(s) para la presente invención se selecciona(n) según su capacidad para activar células T de la mayoría de los pacientes. Preferentemente, se deriva(n) de un antígeno normalmente utilizado para una inmunización rutinaria, tal como toxoide tetánico o antígeno de la difteria. Esto comprende dos ventajas principales. En primer lugar, se ha descrito en dichas moléculas cierto número de epítomos de células T públicos universales, es decir, reconocidos por la inmensa mayoría de los pacientes (Reece J.C. *et al.*, *J. Immunol.* 151, páginas 6175-6184 (1993)). En segundo lugar, como virtualmente todos los individuos se vacunan contra el toxoide tetánico o la difteria, se ha alcanzado ya el cebado con el epítomo de células T utilizado para la presente invención, lo cual deberá aumentar la eficacia de la vacunación, con una posible reducción de las dosis y el número de inyecciones.

Los péptidos utilizados para la inmunización en el contexto de la presente invención se producen preferentemente por síntesis (véase por ejemplo Grant Editions, Synthetic Peptides) mediante un sintetizador de péptidos de biosistema aplicado modelo 430 A ó 431 o mediante técnicas de ADN recombinante para sus secuencias codificadoras de ácidos nucleicos.

La composición que contiene los péptidos se encuentra en una forma adecuada para una inyección por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica. Sin embargo, son posibles formas para inhalación, ingestión o aplicación directa sobre la piel o mucosa.

Los péptidos pueden encontrarse en una forma lineal o cíclica, con o sin restos adicionales utilizados, por ejemplo, para bloquear las interacciones péptido-péptido. Los péptidos pueden encontrarse asimismo integrados en cortas estructuras peptídicas que fuerzan una conformación 3-D específica, tal como una hélice alfa.

La composición puede contener otro material distinto de los péptidos, tal como adyuvantes.

El procedimiento que se describe en la presente invención se puede utilizar para tratar enfermedades de seres humanos o animales en los que se ha demostrado y considerado que los anticuerpos IgE desempeñan un papel en la aparición de los síntomas.

La presente invención se puede aplicar asimismo a pacientes sensibles a alérgenos de origen animal o vegetal, o a compuestos químicos y farmacéuticos, tales como antibióticos (penicilina).

Ejemplos

Ejemplo 1

Se obtiene por síntesis un péptido de 31 aminoácidos constituido por 15 AA representativos de un epítipo de células T de toxoide tetánico (aminoácidos 830 a 844 de la cadena pesada) y 14 AA que contienen un epítipo de células B de *Der pII*, estando separados los dos epítipos por un separador de dos restos de glicina. La secuencia es SEC ID N° 1 QYIKANSKFIGITELGGHEIKKVLVPGCHGS.

Características del péptido

1. El epítipo de células B no es reconocido por anticuerpos IgE

El péptido no es reconocido por anticuerpos IgE producidos por individuos sensibles a la proteína nativa. Esto se establece mediante un inmunoensayo que se lleva a cabo como sigue. El péptido se insolubiliza sobre placas de microtitulación de poliestireno y se añade un panel de muestras de suero de individuos atópicos sensibles a *Der pII*; se detecta la unión de anticuerpos IgE específicos mediante la adición de un reactivo específico de isotipo.

De este modo, se obtiene un péptido (SEC ID N° 2) de secuencia HEIKKVLVPGCHGS que corresponde a los aminoácidos 11-24 de *Der pII* con una síntesis en fase sólida utilizando procedimientos bien conocidos para los expertos en la materia, con un resto de biotina añadido en su extremo de terminal amino. El péptido se insolubiliza sobre placas revestidas con neutravidina y se deja que reaccione con el suero de un individuo atópico. En la Figura 2 se muestran los resultados de dicho experimento. Así, el suero de un individuo atópico con anticuerpos IgE hacia *Der pII* se añadió a una placa revestida con neutravidina que se había preincubado con péptidos 12-mer que cubren la secuencia 7-39 de *Der pII* con un solape de 11 aminoácidos. No se observó ninguna unión por encima del valor de base para ninguno de los 22 péptidos, lo cual indica la ausencia de anticuerpos IgE capaces de unirse a dichas secuencias.

2. El epítipo de células B es reconocido por anticuerpos IgG de individuos no atópicos

Esto se estableció utilizando un procedimiento de ensayo similar al descrito anteriormente para anticuerpos IgE, excepto en que se utilizaron anticuerpos de cabra anti-IgG humano para la detección de anticuerpos IgG y en que se utilizó una dilución 1/100 de suero. En la Figura 3 se proporcionan resultados representativos de dicho experimento, a partir del cual se puede observar que tiene lugar una unión importante entre los aminoácidos 11 y 24, así como entre los aminoácidos 22 y 34. La región 7-39 de *Der pII* contiene por tanto dos sitios de unión para IgG de individuos no atópicos.

3. El epítipo de células T no es reconocido por anticuerpos IgG de individuos atópicos

Esto se estableció utilizando un procedimiento de ensayo idéntico al ensayo descrito anteriormente para sujetos no atópicos, excepto en que el suero se obtiene en este caso de pacientes hipersensibles a *Der pII*. Los resultados que se muestran en la Figura 4 indican que los IgG de individuos atópicos no se unen a la región 11-24 de *Der pII*. Una minoría de pacientes presentan anticuerpos que reaccionan con el péptido 8-19.

4. La región 11-24 de Der pII no contiene un epítipo de células T

Esto se estableció mediante ensayos de proliferación de células T utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia (véase por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, eds Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM and Strober W, Capítulo 3, Greene Publishing Associates & John Wiley & Sons, 1992-1998). Se separan células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) de la sangre entera por centrifugación con gradiente de densidades. La suspensión de PBMC se incubó a continuación durante 4 a 6 días, ya sea con rDER pII o con un péptido 12-mer incluido en la región de 7-39 de Der pII. Los resultados que se muestran en la Figura 5 indican que la adición de péptido 11-22 a la suspensión de PBMC no dio como resultado una proliferación de células T, mientras que se observó una proliferación importante con el péptido 22-33 y con PHA, utilizándose este último como testigo positivo.

Utilización del péptido híbrido

15 El péptido (SEC ID N° 1) se mezcla con un adyuvante adecuado para una administración a seres humanos con el fin de aumentar su inmunogenicidad. Así, se utiliza muramil-dipéptido (MDP) y se acopla covalentemente con el péptido según los procedimientos publicados (Matsumoto K *et al.*, *Immunostimulants: Now and Tomorrow*, Eds I. Azuma y G. Jolles, páginas 79-97 (1987), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlín).

20 La mezcla que contiene el péptido y MDP se administra a continuación a un paciente sensible a *Der pII*. De este modo, se prepara una suspensión que contiene 100 $\mu\text{g/ml}$ de péptido en una solución salina que contiene el 0,3% de albúmina de suero humano y el 0,4% de fenol. Un ml de la solución se inyecta en el brazo por vía subcutánea.

25 Ejemplo 2

Se puede preparar el compuesto de la presente invención mediante la tecnología de cADN recombinante para producir un polipéptido constituido por una serie de unidades repetitivas de péptido que contienen epítomos de células T y B. Se produce mediante tecnología de ADN un polipéptido constituido por un epítomo de células T duplicado derivado de TT (aminoácidos 830 a 844 de la cadena pesada) y seis epítomos de células B repetitivos derivados de Der pII. Una secuencia de dos residuos de aminoácido se inserta entre cada epítomo. La secuencia es: D-(QYIKANSKFIGITELX)₂-(CHGSEPCIIHRGKPF_X)₅-CHGSEPCIIHRGKPF_{SR}, en la que X es GG ó SS.

Dicho polipéptido se obtiene como sigue. Se deducen la secuencia nucleotídica del epítipo TT que corresponde a QYIKANSKFIGITEL (SEC ID N° 13) y el epítipo de Der pII 21-35 que corresponde a CHGSEPCIHRGKPF (SEC ID N° 14). Se realiza un ensamblaje teórico a partir de nucleótidos que corresponden, por una parte, a la secuencia de epítipo TT - GG - epítipo TT (subunidad T) y, por otra parte, a dos copias del epítipo de Der pII separado por una secuencia GG (subunidad B). Se sintetizan oligonucleótidos que cubren la secuencia completa de cada subunidad (una subunidad T y una subunidad B). La secuencia de ADN completa que codifica las dos unidades se obtiene mediante PCR.

Para las dos subunidades TT, el cebador de sentido directo es: GTATCTCTCGAGAAAAGAGATCAATACAT
TAAGGCTAACAGTAAGTTCATTGG (SEC ID N° 7); y el cebador antisentido es: AAACAGCCTCTAGAGAGTTC
GGTAATGCCGATAAACTTTGAATTGGCTTTGATGTACTGACCGCCAAGCTCTGTGATTCCAATGAAGTTAC
TGTTAGCC (SEC ID N° 8).

Para las dos subunidades B, el cebador de sentido directo es: GTATCTACTAGTTGCCATGGTTCAGAACCATG
TATCATTCATCGTGGTAAACCATTCGCGCGTTGTACACGGAAGTGAGCCTTGCAATTATACACAGAGGAAAGC
(SEC ID N° 9); y el cebador antisentido es: CGTATGTGTCGACCCGCTATCTAGAGAACGGCTTTCCTCTGTGTA
TA-ATGC (SEC ID N° 10).

La secuencia de ADN completa que corresponde al polipéptido se obtiene por multimerización direccional de subunidades, utilizando secuencias flanqueadas por sitios de enzimas de restricción que generan extremos compatibles.

La secuencia del polipéptido final de 137 aminoácidos es: DQYIKANSKFIGITELGGQYIKANSKFIGITELSS
CHGSEPCIIHRGKPFGGCHGSEPCIIHRGKPFSSCHGSEPCIIHRGKPFGGCHGSEPCIIHRGKPFSSCHGSEPCII
HRGKPFGGCHGSEPCIIHRGKPFSSR (SEC ID Nº 3).

60 El péptido CHGSEPCIIHRGKPF (SEC ID N° 14) que corresponde a la secuencia de 21-35 aminoácidos de Der pII no contiene un epítipo que se une a IgE, tal como se demuestra en un ensayo similar al que se describe en la Figura 2. Este contiene sin embargo un epítipo reconocido por anticuerpos IgG de individuos no atópicos, pero no de sujetos atópicos, tal como se muestra utilizando sistemas de ensayo similares a los que se describen en la Figura 3 y la Figura 4, respectivamente.

El polipéptido de 137 aminoácidos se produce en cultivos de levadura utilizando una metodología bien conocida por los expertos en la materia, y que se puede encontrar en textos de referencia, tales como *Current Protocols in Molecular Biology*, eds Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K, capítulo 16.13,

John Wiley & Sons, 1994-1997. El polipéptido se aplica por adsorción sobre hidróxido de aluminio y se administra mediante una inyección subcutánea a una dosis de 100 μ g. Se proporcionan dos inyecciones en un intervalo de 3 semanas.

Ejemplo 3

La secuencia nucleotídica que codifica el compuesto de la presente invención se puede utilizar para una inmunización génica directa. Dicha vacuna basada en ADN se puede administrar por diferentes vías (es decir, intramuscular, intradérmica, subcutánea y oral) utilizando ADN “puro”, ADN encapsulado o ADN en forma de micro- o nanopartículas tales como quitosano (K. Roy *et al.*, Nature Medicine 1999; 5: 387-391).

Una construcción nucleotídica preparada como en el Ejemplo 2, pero que contiene la secuencia de ADN que codifica un epítipo de células T derivado de TT y 2 epítipos de células B derivados de Der pII, estando separado cada epítipo por la secuencia GGAGGT ó GGCGGT que codifica 2 restos de glicina, se utiliza para una inmunización directa mediante una inyección intramuscular. La secuencia nucleotídica está flanqueada en 5' por una secuencia que contiene un sitio de restricción EcoRI y una secuencia KOZAK (es decir, GAATTCACCATGG (SEC ID N° 16)) y en 3' por un codón de terminación y un sitio de restricción NotI (es decir TAGGCGGCCGC (SEC ID N° 17)), y se inserta en un vector adecuado.

El cebador de sentido directo es: CCGGAATTCCCACCATGGATCAGTA-TATAAAAGCAAATTCTAAATTTA TAGGTATAACTGAAGTAGGAGGTTGCCATGGTTCAG-AACCATGTATCATTTCATCG (SEC ID N° 11); y el cebador antisentido es: TCGAGCGGCCGCTTAGAACGGCTTTCTCTGTGTATAATGCAAGGCTCACTTCCGTGAC AACCGCCGAATGGTTTACCACGATGAATGATACATGGTTCTGAACC (SEC ID N° 12).

La construcción de la secuencia GAATTCACCATGGATCAGTATATAAAA-GCAAATTCTAAATTTATAGG TATAACTGAAGTAGGAGGTTGCCATGGTTCAGAACCATGTATCATTTCATCGTGGTAAACCATTCGGCGGTT GTCACGGAAGTGAGCCTTGCAATTATACACAGAGGAAAGCCGTTCTAAGCGGCCGC (SEC ID N° 6) se utiliza para la inmunización de ratones. Seis ratones Balb/c se ceban con TT en el día -7. En el día 0, se anestesian los ratones y se suministran inyecciones intramusculares de 100 μ g de ADN en intervalos de dos semanas. Se sangran los ratones después de tres inyecciones y se evalúa el suero para determinar la presencia de anticuerpos para el epítipo de células B producido a partir de la construcción de ADN y para la molécula de Der pII nativa de longitud completa.

Ejemplo 4

Se obtiene por síntesis un péptido de 40 aminoácidos constituido por 13 AA representativos de un epítipo de células T del virus de la influenza A, una secuencia GKKG que corresponde a un sitio sensible a proteasa canónica, un epítipo de células T idéntico repetido, un segundo GKKG y 6 AA que contienen un epítipo de células B de Der pI. La secuencia es PKYVKQNTLKLATGKKGPKYVKQNTLKLATGKKGVIIIGIK (SEC ID N° 4).

Se demuestran las mismas características que en el ejemplo 1 utilizando sistemas de ensayo similares.

Ejemplo 5

La secuencia de tipo salvaje del resto que contiene el epítipo de células B se puede modificar de tal manera, que se elimina un epítipo de células T intrínseco mientras que se mantiene una completa inmunogenicidad del determinante de B, gracias a la presencia de otro epítipo de células T funcional dentro del péptido inmunizante.

De este modo, se produce por síntesis un péptido con una longitud de 32 aminoácidos de secuencia QYIKANSKFI GITELGGCHGSEPCNIHRGKPF (secuencia ID n° 5), como en el Ejemplo 1. Dicho péptido corresponde a un epítipo de células T derivado de TT (aminoácidos 830 a 844) y un epítipo de células B derivado de Der pII, separado por un separador de GG. La secuencia del epítipo de células B presenta una sustitución puntual en la posición 28, es decir, una sustitución de I a N, que se mostró que elimina un epítipo de células T principal mediante sistemas de ensayo, tal como se describe en la Figura 5.

El péptido se utiliza para la inmunización de ratones. Así, a seis ratones Balb/c se les inyectaron en cada pata 50 μ l de una emulsión que contenía 50 μ g del péptido en adyuvante de Freund completo. El mismo procedimiento de inyección se utiliza dos veces en un intervalo de dos semanas, excepto en la utilización de adyuvante de Freund incompleto. Dos semanas después de la última inyección, se sangran los ratones y el suero mostró que contenía anticuerpos específicos para el epítipo de células B de Der pII incluido en el péptido sintético utilizado para la inmunización, y para la proteína de Der pII de longitud completa. Se obtienen nodos linfáticos de drenaje regionales para la preparación de una suspensión de células T. Se muestra que estas últimas proliferan en presencia de TT, pero no en presencia de Der pII o el péptido que corresponde al resto de célula B utilizado para la inmunización.

Ejemplo 6

Se pueden utilizar múltiples péptidos antigénicos para una inmunización con la ventaja de una inmunogenicidad aumentada y la posibilidad de utilizar un inmunógeno que contiene epítomos de B derivados de diferentes moléculas de alergen, posiblemente no relacionadas. Se sintetizan múltiples péptidos antigénicos, o péptidos ramificados, según procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Se puede encontrar una descripción apropiada de la metodología, por ejemplo, en Tam J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 5409-5413.

Se prepara sintéticamente un péptido nuclear constituido por 8 restos de lisina (K). Cada grupo de épsilon-amino K puede ser sustituido por un péptido particular unido a la cadena principal de K mediante un enlace peptídico. Por tanto, los 2 primeros residuos son sustituidos por la secuencia QYIKANSKFIGITEL (SEC ID N° 13) que corresponde al epítomo de células T de TT (aminoácidos de 830 a 844). Los residuos 3 y 4 son sustituidos con la secuencia CHGSEPC NIHRGKPF (SEC ID N° 14) que corresponde al epítomo de células B derivado de Der pII con una sustitución puntual I28N. Los residuos 5 y 6 son sustituidos con la secuencia VIIGIK que contiene un epítomo de células B derivado de Der pI, tal como se muestra en el Ejemplo 4. Los residuos 7 y 8 son sustituidos con la secuencia PKYVKQNTLKLAT (SEC ID N° 15) que corresponde a un epítomo de células T principal del virus de la influenza A.

El péptido ramificado sustituido se utiliza para inmunizar ratones Balb/c mediante el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 5. Se muestra que el suero contiene anticuerpos para proteínas Der pII y Der pI de longitud completa y para los dos epítomos de células B derivados de estos dos alergen. Los ensayos de proliferación de células T muestran una respuesta positiva a TT y a la proteína viral de la influenza A que contiene la secuencia de epítomo de células T.

Ejemplo 7

La secuencia nucleotídica que codifica el compuesto de la presente invención se puede administrar mediante la tecnología de transferencia genética utilizando vectores virales o no virales recombinantes (p.ej. bicapas de lípidos artificiales), conjugados moleculares u organismos recombinantes modificados derivados, por ejemplo, de salmonella o micobacterias.

Por tanto, se obtiene por manipulación génica un vehículo adenoviral que contiene la misma secuencia de ADN que en el Ejemplo 3. Dicho vector se prepara a partir de dos componentes: un vector de ADN adenoviral (Ad5 E1-E3-) y una línea celular de encapsidación. Las secuencias que codifican un epítomo de células T y dos epítomos de células B se insertan en primer lugar en el plásmido pAd. El plásmido quimérico linealizado se cotransfecta a continuación utilizando técnicas de transferencia de ADN convencionales con el genoma Ad restringido en 293 células de encapsidación que transcomplementan E1 para una recombinación homóloga *in vivo*.

La cepa viral preparada en 293 células proporciona títulos en el intervalo de 3×10^{10} a 2×10^{11} unidades formadoras de placa por ml (pfu/ml).

Se administran 10^7 pfu mediante inhalación a ratones Balb/c. Se sangran los ratones tres semanas después y se evalúan el nivel de anticuerpos hacia Der pII y el resto de célula B contenido en la construcción inmunizante, mediante un análisis ELISA de unión directa, como en la Figura 3.

Ejemplo 8

Se puede evaluar la inmunidad para seres humanos del compuesto de la presente invención en un modelo animal humanizado. Para este propósito, se reconstituyen ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) con células inmunocompetentes de origen humano. Se inyectan células mononucleares de sangre periférica (PMBC; 15×10^6 por ratón) obtenidas a partir de un donante atópico sensible a Der pII, en el peritoneo de cada ratón con SCID. A seis ratones reconstituidos de tal manera se les inyectan en los días 1, 15 y 30, $50 \mu\text{g}$ del polipéptido recombinante descrito en el ejemplo 2. Se sangran los ratones antes y seis semanas después del comienzo del procedimiento de inmunización. Se evalúa el suero para determinar la presencia de anticuerpos para el polipéptido recombinante y se encuentra que es negativo antes y positivo después de la inmunización utilizando un ensayo de unión directa similar al que se describe en la Figura 4.

ES 2 279 625 T3

Ejemplo 9

Composición cosmética para higiene de la piel

5		% en peso
	Fase oleaginosa	
10	BRIJ 721 (Steareth 21)	4,00
	Alcohol cetílico	10,00
	Aceite mineral	5,00
15	Parahidroxibenzoato de propilo	0,02
	Fase acuosa	
20	CARBOPOL 943 (Carbomer 934)	0,10
	Hidróxido de sodio (solución al 10%)	0,10
	Parahidroxibenzoato de metilo	0,18
25	Compuestos según los ejemplos 1 a 3	0,50 - 5,00
	Agua desmineralizada	75,60 - 80,10
30	Total:	100

La composición cosmética según la presente invención se puede utilizar en forma de crema directamente sobre la piel del paciente. Los compuestos según la invención se pueden incorporar asimismo a la fase oleaginosa en lugar de ser disueltos en la fase acuosa.

Ejemplo 10

Composición alimenticia (suero lácteo acidificado)

Se obtuvo un suero lácteo que comprende la cepa *Lactobacillus* y dos cepas de *Streptococcus* tradicionalmente utilizadas para la producción de yogur, a partir de lactosuero en polvo reconstituido al 12,5% en agua. Se pasteurizaron 40 l de dicho suero a una temperatura de aproximadamente 92°C durante 6 min, se homogeneizaron a una temperatura de aproximadamente 75°C y una presión de 150 bares (dos niveles) y se enfriaron a una temperatura de aproximadamente 42°C.

El suero lácteo al que se había incorporado el compuesto según la invención (péptidos de los ejemplos 1 a 3) se incubó a una temperatura de 42°C y a un pH de aproximadamente 5 y se enfrió a continuación a una temperatura de aproximadamente 5°C.

Dicha composición alimenticia según la presente invención es utilizada directamente por el paciente mediante una administración oral.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto para la prevención y/o el tratamiento de la alergia al ácaro de polvo que comprende:

- por lo menos un determinante antigénico de alergeno del ácaro de polvo que es reconocido por una célula B o un anticuerpo secretado por una célula B de un individuo no atópico a dicho alergeno, y por lo menos un determinante antigénico de un antígeno diferente de dicho alergeno que provoca la activación de las células T;

en el que dicho compuesto se selecciona de entre el grupo constituido por los péptidos que presentan las secuencias siguientes:

SEC ID N° 1: QYIKANSKFIGITELGGHEIKKVLVPGCHGS

SEC ID N° 3:

**DQYIKANSKFIGITELGGQYIKANSKFIGITELSSCHGSEPCI IHRGKP
FGGCHGSEPCI IHRGKPFSSCHGSEPCI IHRGKPFGGCHGSEPCI IHRG
KPFSSCHGSEPCI IHRGKPFGGCHGSEPCI IHRGKPFSSR**

SEC ID N° 4:

PKYVKQNTLKLATGKKGPKYVKQNTLKLATGKKGVIIGIK

SEC ID N° 5: QYIKANSKFIGITELGGCHGSEPCNIHRGKPF

- o una secuencia nucleotídica que codifica por lo menos una de dichas secuencias de aminoácidos,
- o la secuencia nucleotídica SEC ID n° 6:

GAATTCCCACCATGGATCAGTATATAAAAGCAAATTCTAAATTT

ATAGGTATAACTGAACTAGGAGGTTGCCATGGTTCAGAACCATGTATCATTTCATCGT

GGTAAACCATTCGGCGGTTGTACGGAAGTGAGCCTTGCAATTATACACAGAGGAAAG

CCGTTCTAAGCGGCCGC .

2. Compuesto para la prevención y/o el tratamiento de la alergia al ácaro de polvo, que comprende una secuencia nucleotídica que codifica los dos determinantes antigénicos del compuesto según la reivindicación 1, estando dicha secuencia unida a una o más secuencias reguladoras activas en una célula del paciente.

3. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Composición cosmética que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y un excipiente cosmético aceptable.

5. Composición de bebida, alimento y/o pienso que comprende el compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2 y un excipiente aceptable para líquidos, alimentos y/o piensos.

6. Compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2, para su utilización como medicamento.

7. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o la composición farmacéutica según la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la alergia al ácaro de polvo o de una enfermedad de origen alérgico al ácaro de polvo, particularmente la alergia al ácaro de polvo de hipersensibilidad inmediata.

8. Utilización según la reivindicación 7, en la que la enfermedad se selecciona de entre el grupo constituido por rinitis y sinusitis de origen alérgico, asma bronquial, dermatitis atópica, algunas formas de urticaria aguda y crónica, reacciones anafilácticas asociadas con hipersensibilidades a fármacos y/o una mezcla de los mismos.

Dominancia clonal

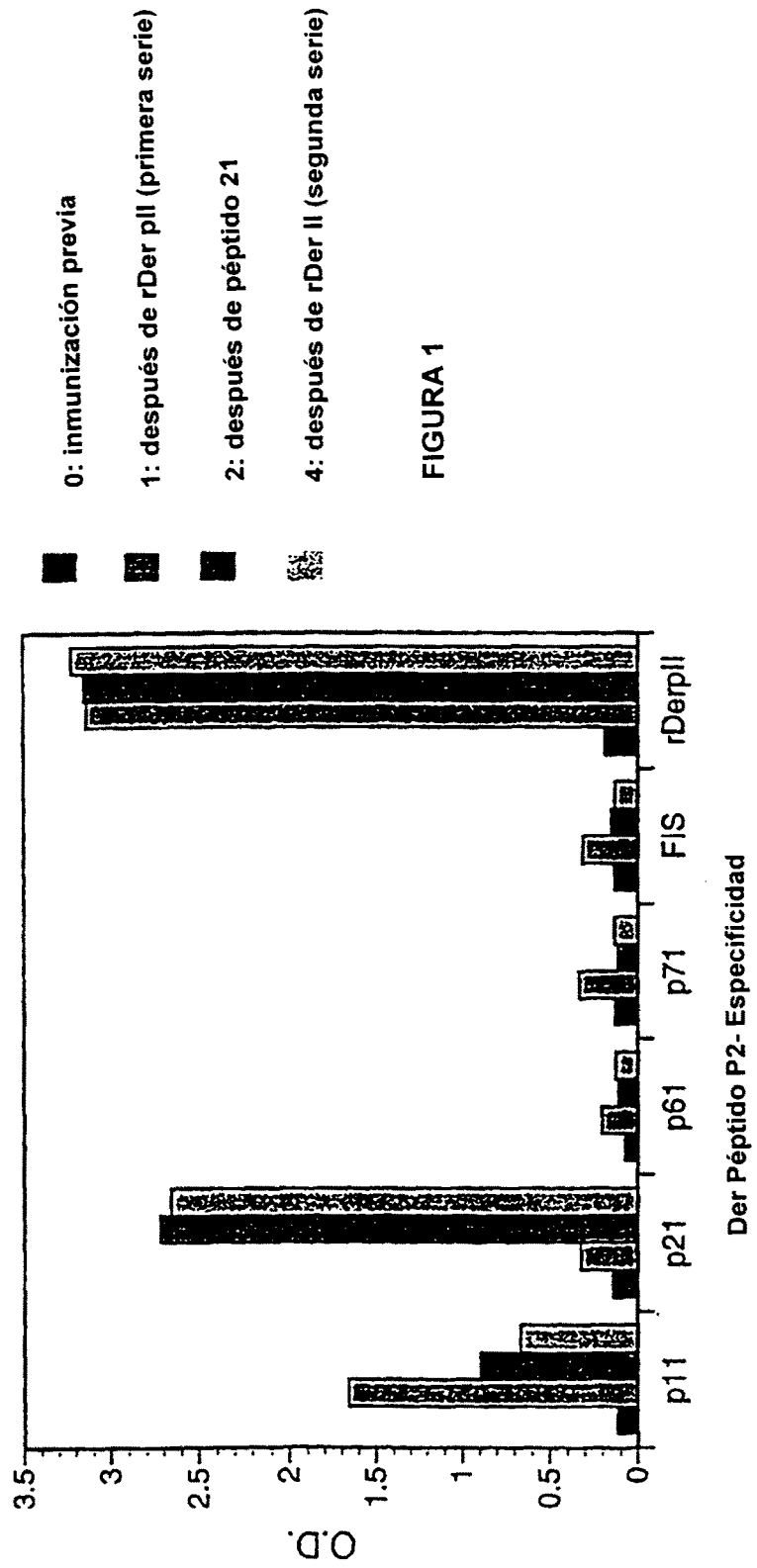


FIGURA 1

Reactividad de péptidos DerpII con IgE humano

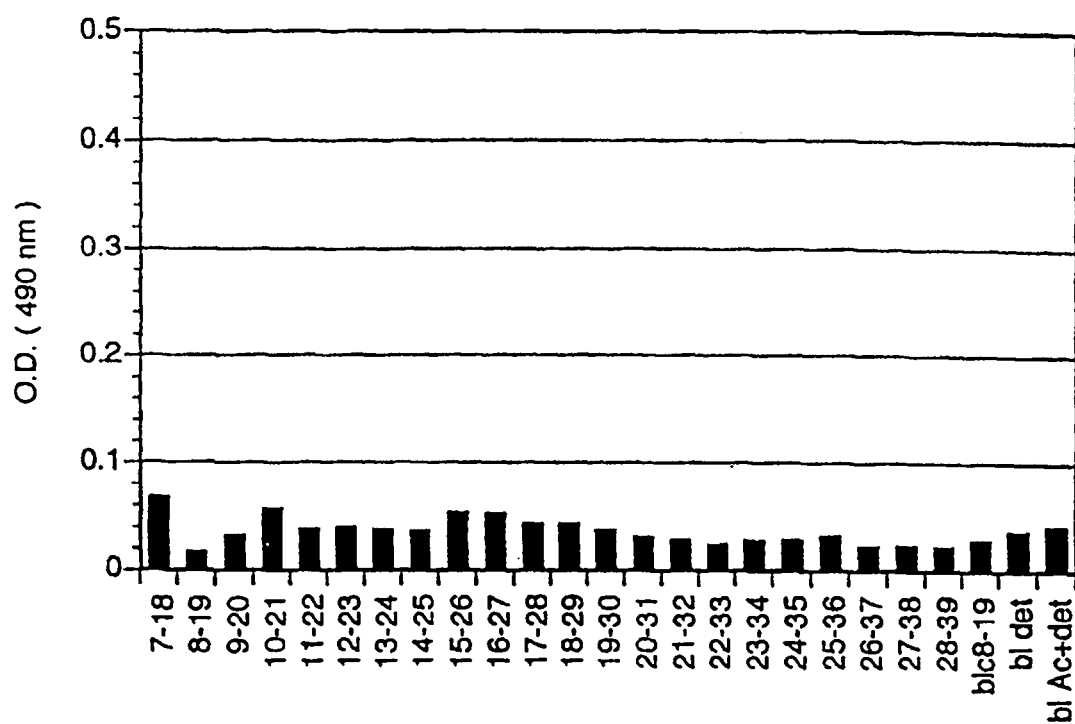


FIGURA 2

Reactividad de DerpII con IgG de sujetos no atópicos

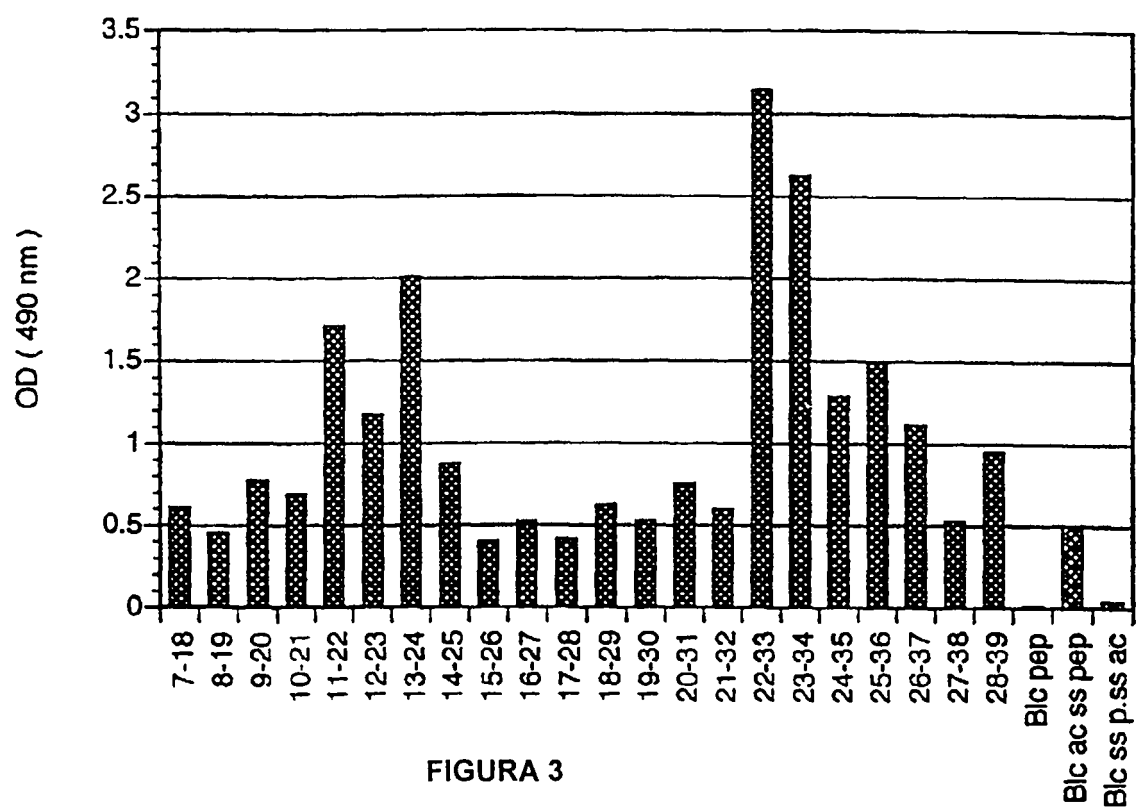


FIGURA 3

Reactividad de péptidos DerpII con IgG de pacientes atópicos

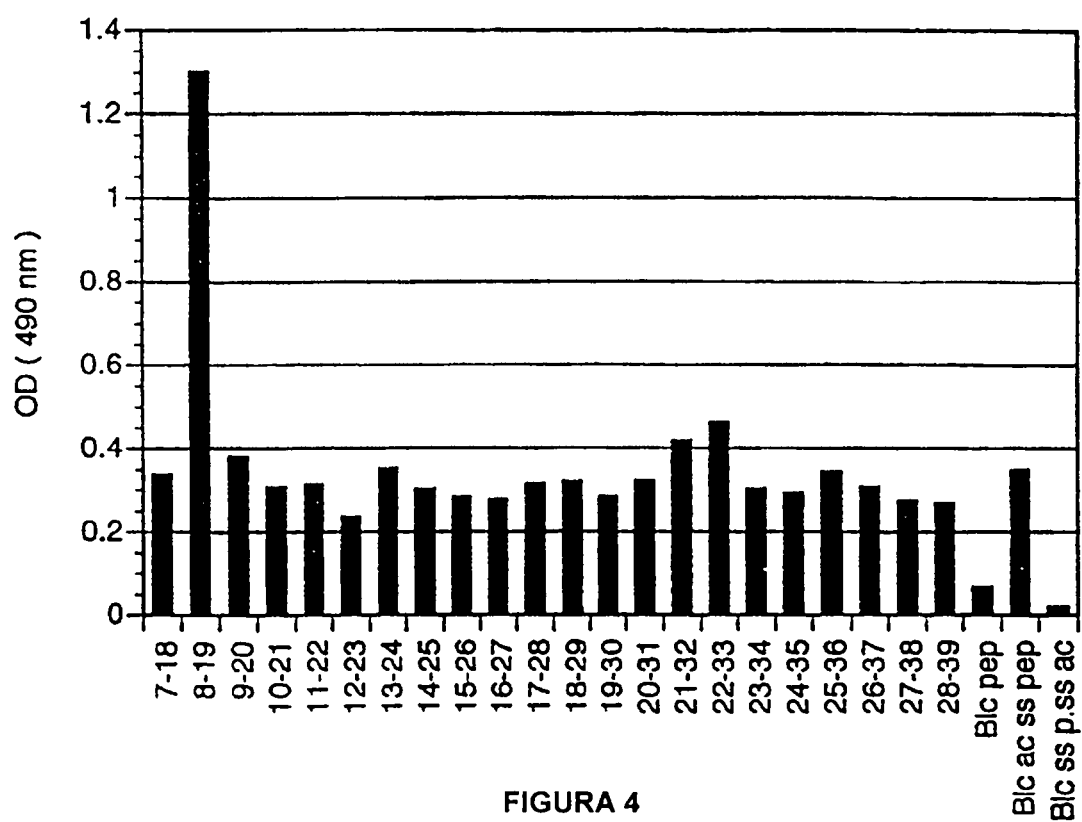


FIGURA 4

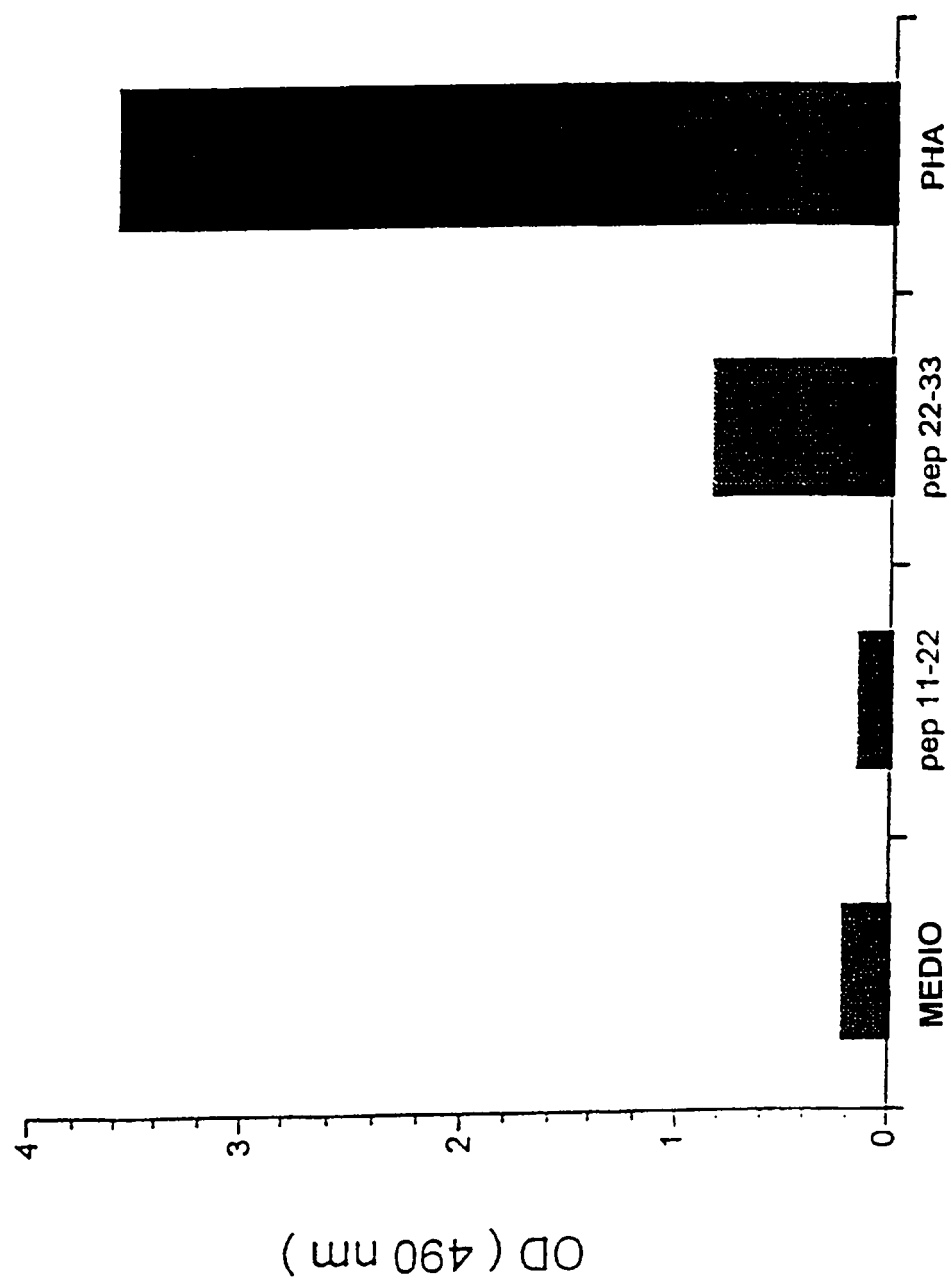


FIGURA 5

ES 2 279 625 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> U.C.B. S.A.

5 <120> COMPUESTO Y PROCEDIMIENTO PARA LA PREVENCIÓN Y/O EL TRATAMIENTO DE ALERGIAS

<130> P.UCB.09/WO

10 <140>
<141>

15 <160> 17

<170> PatentIn Ver 2.1.

<210> 1

20 <211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 1

Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr	Glu	Leu	Gly
1				5				10					15		
Gly	His	Glu	Ile	Lys	Lys	Val	Leu	Val	Pro	Gly	Cys	His	Gly	Ser	
			20					25					30		

35

<210> 2

<211> 14

40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2

His	Glu	Ile	Lys	Lys	Val	Leu	Val	Pro	Gly	Cys	His	Gly	Ser
1				5				10					

50

<210> 3

55 <211> 137
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

65

ES 2 279 625 T3

<400> 3

```

5      Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
      1          5          10          15

10     Gly Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu
      20          25          30

15     Leu Ser Ser Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys
      35          40          45

20     Pro Phe Gly Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly
      50          55          60

25     Lys Pro Phe Ser Ser Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg
      65          70          75          80

30     Gly Lys Pro Phe Gly Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His
      85          90          95

35     Arg Gly Lys Pro Phe Ser Ser Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile
      100         105         110

40     His Arg Gly Lys Pro Phe Gly Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile
      115         120         125

45     Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Ser Arg
      130         135

```

<210> 4

40 <211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 4

```

55     Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Lys Lys
      1          5          10          15

      Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Lys
      20          25          30

      Lys Gly Val Ile Ile Gly Ile Lys
      35          40

```

60 <210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

ES 2 279 625 T3

<400> 5

5 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Asn Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
20 25 30

<210> 6

10 <211> 175

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia nucleotídica sintética

20 <400> 6

25 **gaattccac catggatcag tatataaaag caaattctaa atttataggt ataactgaac 60**
taggaggttg ccatggttca gaaccatgta tcattcatcg tggtaaacca ttcggcgggtt 120
gtcacggaag tgagccttgc attatacaca gaggaaagcc gttctaagcg gccgc 175

<210> 7

<211> 53

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 7

40 gtatctctcg agaaaagaga tcaatacatt aaggctaaca gtaagttcat tgg

53

<210> 8

<211> 99

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 8

55 **aaacagcctc tagagagttc ggtaatgccg ataaactttg aattggcttt gatgtactga 60**
ccgccaagct ctgtgattcc aatgaactta ctgttagcc 99

<210> 9

60 <211> 103

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

ES 2 279 625 T3

<400> 9

5 **gtatctacta gttgccatgg ttcagaacca tgtatcattc atcgtggtaa accattcggc 60**
 ggttgtcacg gaagtgagcc ttgcattata cacagaggaa agc 103

<210> 10

<211> 51

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 10

20 cgtatgtgtc gacccgctat ctagagaacg gcttctctct gtgtataatg c

51

<210> 11

<211> 103

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 11

35 **ccggaattcc caccatggat cagtatataa aagcaaattc taaatttata ggtataactg 60**
 aactaggagg ttgccatggt tcagaacccat gtatcattca tcg 103

<210> 12

40 <211> 105

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 12

50 **tcgagcggcc gcttagaacg gcttctctct gtgtataatg caaggctcac ttccgtgaca 60**
 accgccgaat ggtttaccac gatgaatgat acatggttct gaacc 105

55 <210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

65

ES 2 279 625 T3

<400> 13
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15
 5
 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 14
 Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
 1 5 10 15
 20
 <210> 15
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 15
 35 Thr Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Cys Gly Cys
 1 5 10
 <210> 16
 40 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia KOZAK
 <400> 16
 50 gaattccac catgg 15
 <210> 17
 55 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia que contiene un codón de terminación y un sitio de restricción
 NotI
 65 <400> 17
 taggcggccg c 11