

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 868 631**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)
A61K 39/36 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2017** **PCT/EP2017/075398**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018** **WO18065538**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2017** **E 17781085 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020** **EP 3522921**

54 Título: **Prevención de la alergia**

30 Prioridad:

05.10.2016 EP 16192425
16.05.2017 EP 17171268

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.10.2021

73 Titular/es:

ASIT BIOTECH S.A. (100.0%)
avenue Ariane 5
1200 Bruxelles, BE

72 Inventor/es:

LEGON, THIERRY y
THIRION, GAETAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 868 631 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

Prevención de la alergia

- 5 La presente invención se refiere a preparaciones para prevenir el desarrollo de una alergia y a métodos y usos relacionados con las mismas.

10 Las alergias se basan en una hipersensibilidad del sistema inmunitario a algo en el entorno que habitualmente provoca pocos problemas o ninguno a la mayoría de las personas. Comprende rinitis alérgica estacional, alergias alimentarias, dermatitis atópica, asma alérgica y anafilaxia. Las alergias son comunes en el mundo desarrollado.

15 Alérgenos comunes son pólenes, ácaros del polvo doméstico, mohos, fármacos, alimentos y caspa y pelo de animales.

Las enfermedades alérgicas tienen una fuerte relación genética. Es más probable que los padres alérgicos tengan niños alérgicos. Parece que la probabilidad de desarrollar alergias se hereda.

20 Las enfermedades alérgicas más comunes son rinitis, asma y dermatitis atópica. El asma alérgica es un trastorno inflamatorio crónico. El tratamiento sintomático de los trastornos alérgicos comprende la administración de antihistamínicos, antagonistas β y corticosteroides.

25 Además, la denominada inmunoterapia "específica" se basa en una hiposensibilización. Normalmente, a los pacientes con alergia confirmada se les administra una inyección subcutánea de los alérgenos causales específicos. El tratamiento se inicia con pequeñas dosis de alérgeno y las dosis se aumentan. El tratamiento se mantiene normalmente durante varios años. Este tipo de tratamiento adolece de un mal cumplimiento del paciente y se ha cuestionado debido a motivos de seguridad porque un paciente puede padecer reacciones anafilácticas graves.

30 Además de métodos que comprenden inyecciones subcutáneas repetidas, existen también métodos de hiposensibilización oral.

35 El documento US 4.822.611 da a conocer un método para tratar las alergias existentes que comprende el tratamiento oral con alérgenos. Se describe el uso de extractos alérgicos "a granel" disponibles comercialmente que muestran variación de lote a lote y diferencias en extractos de diferentes fabricantes. La preparación de estos extractos no se describe.

40 El documento GB 1 247 614 da a conocer un método de extracción de un alérgeno. El objetivo de este método es disponer de un extracto alérgico más completo y eficaz que incluya todos los componentes extraíbles del alérgeno.

45 El documento US 5.770.698 da a conocer un procedimiento para purificar extractos de proteínas activas alérgicamente. El espectro de la figura 2 del documento US '698 no presenta un pico a 280 nm. Esto implica que el extracto contiene una cantidad significativa de impurezas no proteicas.

El documento WO 99/22762 da a conocer un método similar; por tanto, el producto comprende también grandes cantidades de impurezas no proteicas.

50 El documento US 6.312.711 da a conocer una composición alimentaria o farmacéutica destinada a tratar patologías asociadas con el rechazo de injertos o una reacción autoinmunitaria alérgica que comprende la administración de un complejo de una proteína de estrés y epítopos de una estructura antigénica.

55 El documento WO 2013/011095 da a conocer una preparación farmacéutica para inyección subcutánea que comprende entre 0,5 ng y 200 μ g de HSP70 y entre 0,5 y 100 μ g de fragmentos de una estructura antigénica.

Fukushima Yoichi *et al*, Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 43 (1997), 397-411 dan a conocer un efecto preventivo de fórmulas de hidrolizado de suero lácteo para madres y lactantes contra el desarrollo de la alergia.

60 A pesar de los intensos esfuerzos en el desarrollo de métodos de tratamiento, todavía no se ha abordado suficientemente. Existe todavía la necesidad de tratamientos mejorados de las alergias.

Hasta ahora, no ha habido ningún tratamiento profiláctico excepto evitar la exposición a los alérgenos.

65 Sorprendentemente, se ha encontrado que es posible realizar un tratamiento profiláctico para evitar el desarrollo de alergias.

La invención se refiere a una preparación que comprende péptidos de un alérgeno natural para su uso en la prevención de la alergia, en la que la preparación se administra antes del desarrollo de cualquier alergia contra el alérgeno usado para la preparación.

5

La presente invención usa péptidos de alérgenos para prevenir el desarrollo de la alergia administrando pequeñas cantidades de los péptidos para prevenir un desarrollo posterior de una alergia.

10

Según la técnica anterior, un paciente que padece alergia se trata con un fármaco para suprimir los síntomas de la alergia o mediante hiposensibilización que puede reducir las reacciones del paciente a los alérgenos.

En contraste con estos métodos, la presente invención pretende prevenir el desarrollo de la alergia en un paciente que corre el riesgo de desarrollar una alergia.

15

Por tanto, la materia de la presente invención es una preparación que comprende péptidos de un alérgeno natural para su uso en la prevención de la alergia o más específicamente para la prevención del desarrollo de la alergia.

20

La materia de la invención es una preparación que comprende péptidos de alérgenos naturales para su uso en la prevención del desarrollo de la alergia.

En otras palabras, la invención proporciona un método mediante el cual puede inducirse un efecto de memoria positivo o tolerogénico hacia un compuesto que aún no es alergénico pero que podría llegar a ser alergénico en un paciente en riesgo.

25

Preferiblemente, la preparación se administra de 2 a 10 veces, preferiblemente a intervalos de 2 a 10 días, por ejemplo, una vez a la semana.

30

La preparación puede administrarse en cantidades constantes o cantidades crecientes.

Preferiblemente, la preparación está libre de adyuvantes estimulantes inmunitarios.

35

Por ejemplo, si uno o ambos de los padres padecen alergia a los cacahuets, existe un riesgo aumentado de que los niños desarrollen alergia a los cacahuets también. La alergia a los cacahuets puede ser potencialmente mortal.

Según el método de la invención, podría tratarse a un niño antes de cualquier contacto con cacahuets para desarrollar un estado del sistema inmunitario que previene el desarrollo de la alergia a los cacahuets.

40

Los péptidos de un alérgeno son péptidos de alérgeno hidrolizados.

En una realización, dichos péptidos de alérgeno hidrolizados pueden obtenerse

45

a) extrayendo una fuente natural de alérgenos que comprende proteínas alergénicas para formar un extracto,

b) purificando dicho extracto para eliminar componentes no proteicos para formar un extracto purificado,

c) desnaturalizando dicho extracto purificado para formar un extracto desnaturalizado purificado,

50

d) hidrolizando el extracto desnaturalizado purificado para formar péptidos de alérgeno hidrolizados.

En una realización adicional, dichos péptidos de alérgeno hidrolizados pueden obtenerse

55

a) extrayendo una fuente de alérgenos que comprende proteínas alergénicas para formar un extracto,

b) purificando el extracto para eliminar componentes no proteicos para formar un extracto purificado,

c) desnaturalizando el extracto purificado con un primer agente desnaturalizante para formar un extracto desnaturalizado purificado,

60

d) refinando el extracto desnaturalizado purificado para eliminar impurezas para formar un extracto desnaturalizado refinado,

65

e) desnaturalizando el extracto desnaturalizado refinado con un segundo agente desnaturalizante para formar una mezcla de alérgenos desnaturalizados, y

f) hidrolizando la mezcla de alérgenos desnaturalizados para formar los péptidos de alérgeno hidrolizados.

Se seleccionan alérgenos preferidos entre alérgenos de polen, alérgenos de leche, alérgenos de veneno, alérgenos de huevo, alérgenos de malezas, alérgenos de hierbas, alérgenos de árboles, alérgenos de arbustos, alérgenos de flores, alérgenos de vegetales, alérgenos de granos, alérgenos de hongos, alérgenos de frutas, alérgenos de bayas, alérgenos de nueces, alérgenos de semillas, alérgenos de frijoles, alérgenos de pescado, alérgenos de moluscos, alérgenos de mariscos, alérgenos de carne, alérgenos de especias, alérgenos de insectos, alérgenos de ácaros, alérgenos de moho, alérgenos de animales, alérgenos de garrapatas de paloma, alérgenos de gusanos, alérgenos de corales blandos, alérgenos de caspa de animales, alérgenos de nematodos, alérgenos de *Hevea brasiliensis*.

Preferiblemente, se usan e hidrolizan alérgenos naturales, aunque podrían ser adecuadas también preparaciones recombinantes.

En una realización, la desnaturalización se realiza con un agente desnaturalizante seleccionado del grupo de agentes caotrópicos, agentes reductores y mezclas de los mismos, preferiblemente entre urea, cloruro de guanidinio, ditiotretitol, tioglicerol, β -mercaptoetanol, TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) y mezclas de los mismos.

En una realización, la hidrólisis se realiza con una enzima, preferiblemente pepsina, tripsina o quimiotripsina, más preferiblemente en la que la hidrólisis se realiza en presencia de un agente caotrópico, preferiblemente seleccionado de urea y cloruro de guanidinio y un reactivo reductor preferiblemente de TCEP o DTT.

En una realización, el método comprende además purificar los alérgenos hidrolizados para eliminar péptidos con pesos moleculares por encima de 10.000 Da y por debajo de 1.000 Da, en el que el 70%, más preferiblemente el 80% de los péptidos están entre 10.000 Da y 1.000 Da.

Una realización adicional es el uso de la preparación como una vacuna contra la alergia.

Una realización adicional es un método de prevención de la alergia que comprende administrar la preparación de la invención a un paciente en riesgo de desarrollar alergia.

El documento WO 2008/000783 describe un método de purificación de alérgenos que supera al menos algunos de los inconvenientes de la técnica anterior, especialmente para proporcionar antígenos de alérgenos naturales con una capacidad significativamente reducida para desencadenar una reacción de alergenidad en comparación con el extracto de alérgenos en bruto pero capaz de estimular células T también.

El documento WO 2012/172037 da a conocer un método para la producción de alérgenos hidrolizados.

Los efectos de la presente invención se ejemplifican tal como sigue:

Ejemplo 1 - Cacahuete

1. OBJETIVO DEL ESTUDIO:

Evaluación de la inducción de un posible "efecto de memoria" en ratones Balb/c tratados dos veces a la semana durante 3 semanas con 400 μ g de péptidos de cacahuete (ARA/PEP_SOL UBT13J03) en entorno de manitol-trehalosa (las inyecciones se realizaron por vía subcutánea sin ningún adyuvante) y expuestos mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) única de 100 μ g de proteínas nativas de cacahuete sin ningún adyuvante.

2. Resumen del protocolo:

Número de animales	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5		Grupo 6	
	10	ARA/PEP_SOL 13J03	10	ARA/PEP_SOL 13J03	10	ARA/PEP_SOL 13J03	10	ARA/PEP_SOL 13J03	10	ARA/PEP_SOL 13J03	10	PLACEBO
Dosis inyectada (tratamiento)	400 µg		400 µg		400 µg		400 µg		400 µg		400 µg	
Modo de administración (tratamiento)	SC		SC		SC		SC		SC		SC	
Volumen inyectado (tratamiento)	300 µl		300 µl		300 µl		300 µl		300 µl		300 µl	
Calendario de inyecciones (tratamiento)	J0-4-7-11-14 y 18		J0-4-7-11-14 y 18		J0-4-7-11-14 y 18		J0-4-7-11-14 y 18		J0-4-7-11-14 y 18		J0-4-7-11-14 y 18	
Exposición	ARA/ALL_SOL NATIVES 13I12		ARA/ALL_SOL NATIVES 13I12		ARA/ALL_SOL NATIVES 13I12		ARA/ALL_SOL NATIVES 13I12		ARA/ALL_SOL NATIVES 13I12		ARA/ALL_SOL NATIVES 13I12	
Dosis inyectada (exposición)	100 µg		100 µg		100 µg		100 µg		100 µg		100 µg	
Modo de administración (exposición)	IP		IP		IP		IP		IP		IP	
Volumen inyectado (exposición)	200 µl		200 µl		200 µl		200 µl		200 µl		200 µl	
Calendario de inyección (exposición)	J28		J35		J42		J49		J56		J28	

3. Denominación de los grupos:

Grupo 1	13J03-DP / Exposición J28
Grupo 2	13J03-DP / Exposición J35
Grupo 3	13J03-DP / Exposición J42
Grupo 4	13J03-DP / Exposición J49
Grupo 5	13J03-DP / Exposición J56
Grupo 6	PLACEBO (M/T) / Exposición J28

5 4. Correspondencia entre los días tras el inicio del tratamiento y los días tras la exposición:

Todos los grupos tienen el mismo calendario para la fase de tratamiento hasta el día 28

Grupos	Días tras el inicio del tratamiento	Días tras la exposición
1 y 6	28-35-42-49-56-63-70	0-7-14-21-28-35-42
2	35-42-49-56-63-70	0-7-14-21-28-35
3	42-49-56-63-70	0-7-14-21-28
4	49-56-63-70	0-7-14-21
5	56-63-70	0-7-14

10 Precaución:

ARA/PEP_SOL se usa comúnmente para péptidos de cacahuete.

ARA/ALL_SOL se usa comúnmente para proteínas de cacahuete.

15

5. Resultados:

En el presente documento se muestran los resultados obtenidos mediante ELISA para la producción de IgG específicas anti-proteínas de ARA (nativas - recubrimiento de proteínas nativas)

20

a. Evolución de la producción de IgG ANTES de cualquier exposición (desde el día 0 hasta el día 28):

Las figuras 1 y 2 muestran que el tratamiento de los ratones con péptidos de cacahuete como producto farmacológico conduce a una producción muy débil de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de ARA hasta el día 28. Los ratones tratados con PLACEBO no muestran producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de ARA.

25

b. Evolución de la producción de IgG DESPUÉS de la exposición (desde el día de la exposición hasta el día 42 tras la exposición): *precaución: ¡no todos los grupos alcanzan este día 42 tras la exposición!*

Las figuras 3 y 4 muestran la producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de ARA en los sueros de ratones que pertenecen a los grupos tratados con péptidos de ARA y al grupo de placebo. Esta producción aumenta con diferente velocidad según el momento cuando se produjo la exposición. Cuando la exposición se realiza el día 28, 35 y 56 tras el inicio del tratamiento, puede observarse que la producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de ARA se despegan de la del placebo 2 semanas después de la exposición. Para los grupos en los que la exposición se producía el día 42 y 49 tras el inicio del tratamiento, no se observa diferencia en la producción de IgG con respecto a la del placebo hasta el día 21 tras la exposición (e incluso hasta el día 28 tras la exposición para el grupo de D42-exposición = grupo 3).

35

Para el grupo 1, cuando la exposición se realiza el día 28 tras el inicio del tratamiento, parece alcanzarse un máximo en la producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de ARA el día 28 tras la exposición después del descenso hasta un estado de meseta el D35 (y posterior) tras el tratamiento.

40

Para el grupo 2, cuando la exposición se realiza el día 35 tras el inicio del tratamiento, se alcanza un máximo el día 35 tras la exposición pero no se dispone de los puntos de tiempo posteriores, de modo que no puede concluirse si este punto es correctamente un máximo o si la producción aumentará de nuevo en puntos de tiempo posteriores.

45

Los valores de títulos más altos de cada grupo son los siguientes:

Días tras la exposición	TÍTULOS MEDIOS/MEDIANA de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de ARA
	Títulos de valor máximo
Grupo 1	D28 = 10,892 / 11,653
Grupo 2	D35 = 8,900 / 8,894
Grupo 3	D28 = 2,103 / 1,022
Grupo 4	D21 = 1,849 / 947
Grupo 5	D14 = 8,171 / 6,543
Grupo 6	D42 = 990 / 990

6. Conclusiones:

A partir de todos estos resultados, pueden concluirse los siguientes puntos:

- El tratamiento con péptidos de ARA tal como se describe en este protocolo induce una producción muy débil de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de ARA hasta el día 28 (tras el inicio del tratamiento).
- No se observa producción de IgG específica en los grupos de placebo durante la fase de tratamiento hasta el día 28 (tras el inicio del tratamiento).
- La exposición con una dosis única de 100 µg de proteínas nativas de ARA potencia el efecto del tratamiento permitiendo una inducción de la producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de ARA que alcanza un máximo 4 semanas después de la exposición para el grupo expuesto el día 28 tras el inicio del tratamiento. Este efecto no se observa en los grupos de placebo que recibieron también la misma exposición. De ese modo, puede concluirse que la exposición no es suficiente *per se* para inducir la producción de IgG 4 semanas después de la exposición (tal como se observa en los grupos de placebo), pero permite la expresión del tratamiento con péptidos de ARA. Obviamente, el tratamiento con péptidos de ARA puede sensibilizar al sistema inmunitario permitiendo un “efecto de memoria” tras una exposición con proteínas nativas.
- La amplitud de la respuesta de IgG depende del momento que separa el final del tratamiento y la exposición. La respuesta es superior en grupos expuestos el día 28, 35 y 56 tras el inicio del tratamiento. Sorprendentemente, los grupos expuestos el día 42 y 49 tras el inicio del tratamiento no parecen mostrar una diferencia significativa que el grupo de placebo. Quizá la producción se retrasa en estos grupos... Podría responderse a esa pregunta cuando se hayan sometido a prueba los puntos de tiempo posteriores.
- Todos estos resultados se refieren a proteínas nativas de ARA que son las proteínas más cercanas a los alérgenos naturales.

Ejemplo 2 - Ácaros del polvo doméstico

Evaluación de la inducción de un posible “efecto de memoria” en ratones Balb/c tratados dos veces a la semana durante 3 semanas con 400 µg de péptidos de ácaros del polvo doméstico (HDM/PEP_SOL UBT15H20) en entorno de manitol-trehalosa (las inyecciones se realizaron por vía subcutánea sin ningún adyuvante) y expuestos mediante una inyección i.p. única de 100 µg de proteínas nativas de ácaros del polvo doméstico sin ningún adyuvante.

7. Resumen del protocolo:

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
Número de animales	15	15	15	15	10	10	10	10
Tratamiento: antígenos en M/T	HDM/PEP_SOL 15H20	HDM/PEP_SOL 15H20	HDM/PEP_SOL 15H20	HDM/PEP_SOL 15H20	PLACEBO	PLACEBO	PLACEBO	PLACEBO
Dosis inyectada (tratamiento)	400 µg	400 µg	400 µg	400 µg	400 µg	400 µg	400 µg	400 µg
Modo de administración (tratamiento)	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Volumen inyectado (tratamiento)	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Calendario de inyecciones (tratamiento)	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18
Exposición	HDM/ALL_SOL NATIVES 13G04nat	HDM/ALL_SOL NATIVES 13G04nat	HDM/ALL_SOL NATIVES 13G04nat	HDM/ALL_SOL NATIVES 13G04nat	HDM/ALL_SOL NATIVES 13G04nat	HDM/ALL_SOL NATIVES 13G04nat	HDM/ALL_SOL NATIVES 13G04nat	HDM/ALL_SOL NATIVES 13G04nat
Dosis inyectada (exposición)	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg
Modo de administración (exposición)	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP
Volumen inyectado (exposición)	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Calendario de inyección (exposición)	J28	J35	J42	J49	J28	J35	J42	J49

8. Denominación de los grupos:

Grupo 1	15H20-DP / Exposición J28
Grupo 2	15H20-DP / Exposición J35
Grupo 3	15H20-DP / Exposición J42
Grupo 4	15H20-DP / Exposición J49
Grupo 5	PLACEBO (M/T) / Exposición J28
Grupo 6	PLACEBO (M/T) / Exposición J35
Grupo 7	PLACEBO (M/T) / Exposición J42
Grupo 8	PLACEBO (M/T) / Exposición J49

9. Correspondencia entre los días tras el inicio del tratamiento y los días tras la exposición:

5

Todos los grupos tienen el mismo calendario para la fase de tratamiento hasta el día 28

Grupos	Días tras el inicio del tratamiento	Días tras la exposición
1 y 5	28-35-42-49-56-63-70-77-84-91	0-7-14-21-28-35-42-49-56-63
2 y 6	35-42-49-56-63-70-77-84-91-98	0-7-14-21-28-35-42-49-56-63
3 y 7	42-49-56-63-70-77-84-91-98-105	0-7-14-21-28-35-42-49-56-63
4 y 8	49-56-63-70-77-84-91-98-105-112	0-7-14-21-28-35-42-49-56-63

10. Resultados:

10

En el presente documento se muestran los resultados obtenidos mediante ELISA para la producción de IgG específicas anti-proteínas de ácaros del polvo doméstico (nativas - recubrimiento de proteínas nativas).

a. Evolución de la producción de IgG ANTES de cualquier exposición (desde el día 0 hasta el día 28):

15

Las figuras 5 y 6 muestran que el tratamiento de los ratones con péptidos de ácaros del polvo doméstico como producto farmacológico conduce a una producción débil de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de HDM hasta el día 28. Los ratones tratados con PLACEBO no muestran producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de HDM (los grupos 5 a 8 están al mismo nivel)

20

b. Evolución de la producción de IgG después de la exposición (desde el día de la exposición hasta el día 63 tras la exposición):

25

Las figuras 7 y 8 muestran la producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de HDM en los sueros de ratones que pertenecen a los grupos tratados con péptidos de HDM. Esta producción aumenta hasta alcanzar un máximo el día 14 tras la exposición antes del descenso hasta alcanzar un estado de meseta relativo el día 28 (para los grupos 1, 2 y 4) o el día 35 (para el grupo 3) tras la exposición. Esta producción (los niveles de títulos de IgG) parece estar vinculada al momento cuando se produjo la exposición: las producciones de IgG son mayores en los grupos 3 y 4 (expuestos respectivamente el día 42 y 49 tras el inicio del tratamiento) que en los grupos 1 y 2 (expuestos respectivamente el día 28 y 35 tras el inicio del tratamiento).

30

Los valores de títulos a estos puntos de tiempo específicos son los siguientes:

Días tras la exposición	TÍTULOS MEDIOS/MEDIANA DE IgG específicas anti-PROTEÍNAS de HDM	
	Títulos de valor máximo	Títulos de valor de estado de meseta
Grupo 1	D14 = 9,074 / 7,528	D28 = 7,257 / 6,976
Grupo 2	D14 = 19,203 / 15,715	D28 = 11,813 / 11,040
Grupo 3	D14 = 52,547 / 38,826	D35 = 29,552 / 27,798
Grupo 4	D14 = 41,817 / 28,886	D28 = 28,356 / 24,059
Grupo 5	D63 = 458 / 458	/
Grupo 6	D56 = 500 / 500	/
Grupo 7	D63 = 748 / 748	/
Grupo 8	D56 = 462 / 462	/

11. Conclusiones:

A partir de todos estos resultados, se concluyen los siguientes puntos:

- 5 • El tratamiento con péptidos de HDM tal como se describe en este protocolo induce una producción débil de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de HDM hasta el día 28 (tras el inicio del tratamiento).
- 10 • No se observa producción de IgG específicas en los grupos de placebo durante la fase de tratamiento hasta el día 28 (tras el inicio del tratamiento).
- 15 • La exposición con una dosis única de 100 µg de proteínas nativas de HDM potencia el efecto del tratamiento permitiendo una inducción de la producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de HDM que alcanza un máximo 2 semanas después de la exposición. Este efecto no se observa en los grupos de placebo que recibieron también la misma exposición. De ese modo, puede concluirse que la exposición no es suficiente sola para inducir la producción de IgG (tal como se observa en los grupos de placebo), pero permite la expresión del tratamiento con péptidos de HDM. Obviamente, el tratamiento con péptidos de HDM puede sensibilizar al sistema inmunitario permitiendo un “efecto de memoria” después de una exposición con proteínas nativas.
- 20 • La amplitud de la respuesta de IgG depende del momento que separa el final del tratamiento y la exposición. La respuesta es superior para grupos expuestos posteriormente.
- 25 • Todos estos resultados se refieren a proteínas nativas de HDM que son las proteínas más cercanas a alérgenos naturales.

Ejemplo 3 - Ambrosía (ragweed)

30 Evaluación de la inducción de un posible “efecto de memoria” en ratones Balb/c tratados dos veces a la semana durante 3 semanas con 100 µg o 400 µg de péptidos de ambrosía (RAG/PEP_SOL UBT16E03) en entorno de manitol-trehalosa (las inyecciones se realizaron por vía subcutánea sin ningún adyuvante) y expuestos mediante una inyección i.p. única de 100 µg de proteínas nativas de ambrosía sin ningún adyuvante.

7. Resumen del protocolo:

35

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
Número de animales	10	10	10	10	10	10	10
Tratamiento: antígenos en M/T	RAG/PEP_SOL 16E03	RAG/PEP_SOL 16E03	RAG/PEP_SOL 16E03	RAG/PEP_SOL 16E03	RAG/PEP_SOL 16E03	RAG/PEP_SOL 16E03	PLACEBO
Dosis inyectada (tratamiento)	100 µg	100 µg	100 µg	400 µg	400 µg	400 µg	100 µg
Modo de administración (tratamiento)	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Volumen inyectado (tratamiento)	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Calendario de inyecciones (tratamiento)	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18	J0-4-7-11-14 y 18
Exposición	RAG/ALL_SOL NAT 16E17	RAG/ALL_SOL NAT 16E17	RAG/ALL_SOL NAT 16E17	RAG/ALL_SOL NAT 16E17	RAG/ALL_SOL NAT 16E17	RAG/ALL_SOL NAT 16E17	RAG/ALL_SOL NAT 16E17
Dosis inyectada (exposición)	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg
Modo de administración (exposición)	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP
Volumen inyectado (exposición)	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Calendario de inyección (exposición)	J28	J42	J56	J28	J42	J56	J28

8. Denominación de los grupos:

Grupo 1	16E03-DP 100 µg / Exposición D28
Grupo 2	16E03-DP 100 µg / Exposición D42
Grupo 3	16E03-DP 100 µg / Exposición D56
Grupo 4	16E03-DP 400 µg / Exposición D28
Grupo 5	16E03-DP 400 µg / Exposición D42
Grupo 6	16E03-DP 400 µg / Exposición D56
Grupo 7	PLACEBO (M/T) / Exposición J28

9. Correspondencia entre los días tras el inicio del tratamiento y los días tras la exposición:

5

Todos los grupos tienen el mismo calendario para la fase de tratamiento hasta el día 28

Grupos	Días tras el inicio del tratamiento	Días tras la exposición
1, 4 y 7	28-35-42-49-56-63-70-77-84-91	0-7-14-21-28-35-42-49-56-63
2 y 5	42-49-56-63-70-77-84-91-98-105	0-7-14-21-28-35-42-49-56-63
3 y 6	56-63-70-77-84-91-98-105-112-119	0-7-14-21-28-35-42-49-56-63

10. Resultados:

10

En el presente documento se muestran los resultados obtenidos mediante ELISA para la producción de IgG específicas anti-proteínas de ambrosía (nativa - recubrimiento de proteínas nativas).

a. Evolución de la producción de IgG ANTES de cualquier exposición (desde el día 0 hasta el día 28):

15

Las figuras 9 y 10 muestran que el tratamiento de ratones con ambas concentraciones de péptidos de ambrosía como producto farmacológico conduce a una producción débil de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de RAG hasta el día 28 (grupos 1-6). Los ratones tratados con PLACEBO no muestran producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de RAG (grupo 7)

20

b. Evolución de la producción de IgG después de la exposición (desde el día de la exposición hasta el día 56 tras la exposición):

Las figuras 11 y 12 muestran la producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de RAG en los sueros de ratones que pertenecen a los grupos tratados con péptidos de RAG. Esta producción aumenta hasta alcanzar un máximo el día 14-21 tras la exposición antes de un descenso hasta alcanzar un estado de meseta relativo el día 28-42. Esta producción (los niveles de títulos de IgG) parece estar vinculada al momento cuando se produjo la exposición: las producciones de IgG son mayores en los grupos 3 y 6 (expuestos respectivamente el día 56 tras el inicio del tratamiento) que en los grupos 1; 2; 4 y 5 (expuestos respectivamente el día 28 y día 42 tras el inicio del tratamiento).

30

Los valores de títulos a estos puntos de tiempo específicos son los siguientes:

Días tras la exposición	TÍTULOS MEDIOS / MEDIANA de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de RAG	
	Títulos de valor máximo	Títulos de valor de estado de meseta
Grupo 1	D49 = 2,604 / 2,319	D56 = 799 / 722
Grupo 2	D21 = 11,569 / 9,041	D42 = 2,137 / 1,720
Grupo 3	D14 = 28,382 / 15,552	D28 = 6,931 / 4,226
Grupo 4	D7 = 2,655 / 2,341	D56 = 443 / 351
Grupo 5	D14 = 10,744 / 6,699	D42 = 2,620 / 1,361
Grupo 6	D21 = 29,673 / 27,507	D28 = 7,352 / 7,042
Grupo 7	D63 = 99 / 99	D28 = 99 / 99

11. Conclusiones:

35

A partir de todos estos resultados, pueden concluirse los siguientes puntos:

- El tratamiento con péptidos de RAG tal como se describe en este protocolo induce una producción basal débil de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de RAG hasta el día 28 (tras el inicio del tratamiento).
- 5 • No se observa producción de IgG específicas en los grupos de placebo durante todo el estudio (tras el tratamiento y tras la exposición).
- 10 • La exposición con una dosis única de 100 µg de proteínas nativas de RAG potencia el efecto del tratamiento permitiendo una inducción de la producción de IgG específicas anti-PROTEÍNAS de RAG que alcanza un máximo 2 semanas después de la exposición. Este efecto no se observa en los grupos de placebo que recibieron también la misma exposición. De ese modo, puede concluirse que la exposición no es suficiente sola para inducir la producción de IgG (tal como se observa en los grupos de placebo), pero permite la expresión del efecto del tratamiento con péptidos de RAG. En conclusión, el tratamiento con péptidos de RAG puede sensibilizar al sistema inmunitario permitiendo un “efecto de memoria”
15 después de una exposición con proteínas nativas.
- La amplitud de la respuesta de IgG depende del retraso entre el final del tratamiento y la exposición. La respuesta es superior para grupos expuestos posteriormente.
- 20 • La amplitud de la respuesta de IgG después de la exposición es dependiente de la dosis del tratamiento con una mayor respuesta a 400 µg que a 100 µg cuando la exposición se realiza el día 28 y el día 42. Cuando la exposición se realiza posteriormente (día 56), las respuestas de IgG son similares a ambas dosificaciones, probablemente debido a la amplitud de la respuesta.
- 25 • Todos estos resultados se refieren a proteínas nativas de RAG que son las proteínas más cercanas a los alérgenos naturales.

REIVINDICACIONES

1. Preparación que comprende péptidos de un alérgeno natural en la que los péptidos son péptidos de alérgeno hidrolizados para su uso en la prevención del desarrollo de una alergia, en la que la preparación se administra antes del desarrollo de cualquier alergia contra el alérgeno usado para la preparación.
2. Preparación para su uso según la reivindicación 1, en la que la preparación se administra de 2 a 10 veces.
3. Preparación para su uso según la reivindicación 2, en la que la preparación se administra a intervalos de 2 a 10 días.
4. Preparación para su uso según la reivindicación 2 o 3, en la que la preparación se administra en cantidades constantes.
5. La preparación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la preparación está libre de adyuvantes inmunoestimulantes.
6. Preparación para su uso según la reivindicación 1, en la que dichos péptidos de alérgeno hidrolizados pueden obtenerse
 - a) extrayendo una fuente natural de alérgenos que comprende proteínas alergénicas para formar un extracto,
 - b) purificando dicho extracto para eliminar componentes no proteicos para formar un extracto purificado,
 - c) desnaturalizando dicho extracto purificado para formar un extracto desnaturalizado purificado,
 - d) hidrolizando el extracto desnaturalizado purificado para formar péptidos de alérgeno hidrolizados.
7. Preparación para su uso según la reivindicación 1, en la que dichos péptidos de alérgeno hidrolizados pueden obtenerse
 - a) extrayendo una fuente de alérgenos que comprende proteínas alergénicas para formar un extracto,
 - b) purificando el extracto para eliminar componentes no proteicos para formar un extracto purificado,
 - c) desnaturalizando el extracto purificado con un primer agente desnaturalizante para formar un extracto desnaturalizado purificado,
 - d) refinando el extracto desnaturalizado purificado para eliminar impurezas para formar un extracto desnaturalizado refinado,
 - e) desnaturalizando el extracto desnaturalizado refinado con un segundo agente desnaturalizante para formar una mezcla de alérgenos desnaturalizados, y
 - f) hidrolizando la mezcla de alérgenos desnaturalizados para formar los péptidos de alérgeno hidrolizados.
8. Preparación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que los alérgenos se seleccionan entre alérgenos de polen, alérgenos de leche, alérgenos de veneno, alérgenos de huevo, alérgenos de malezas, alérgenos de hierbas, alérgenos de árboles, alérgenos de arbustos, alérgenos de flores, alérgenos de vegetales, alérgenos de granos, alérgenos de hongos, alérgenos de frutas, alérgenos de bayas, alérgenos de nueces, alérgenos de semillas, alérgenos de frijoles, alérgenos de pescado, alérgenos de moluscos, alérgenos de mariscos, alérgenos de carne, alérgenos de especias, alérgenos de insectos, alérgenos de ácaros, alérgenos de moho, alérgenos de animales, alérgenos de garrapatas de paloma, alérgenos de gusanos, alérgenos de corales blandos, alérgenos de caspa de animales, alérgenos de nematodos, alérgenos de *Hevea brasiliensis*.
9. Preparación para su uso según las reivindicaciones anteriores 1 a 8, en la que la desnaturalización se realiza con un agente desnaturalizante seleccionado del grupo de agentes caotrópicos, agentes reductores y mezclas de los mismos, preferiblemente entre urea, cloruro de guanidinio, ditiotreitól, tioglicerol, β -mercaptoetanol, TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) y mezclas de los mismos.

10. Preparación para su uso según una de las reivindicaciones anteriores 1 a 9, en la que la hidrólisis se realiza con una enzima, preferiblemente pepsina, tripsina o quimiotripsina, más preferiblemente en la que la hidrólisis se realiza en presencia de un agente caotrópico, preferiblemente seleccionado de urea y cloruro de guanidinio y un agente reductor preferiblemente de TCEP o DTT.
5
11. Preparación para su uso según una de las reivindicaciones anteriores 1 a 10, que comprende además purificar los alérgenos hidrolizados para eliminar péptidos con pesos moleculares por encima de 10.000 Da y por debajo de 1.000 Da, en la que el 70%, más preferiblemente el 80% de los péptidos tienen entre 10.000 Da y 1.000 Da.
10
12. Preparación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como vacuna contra la alergia.

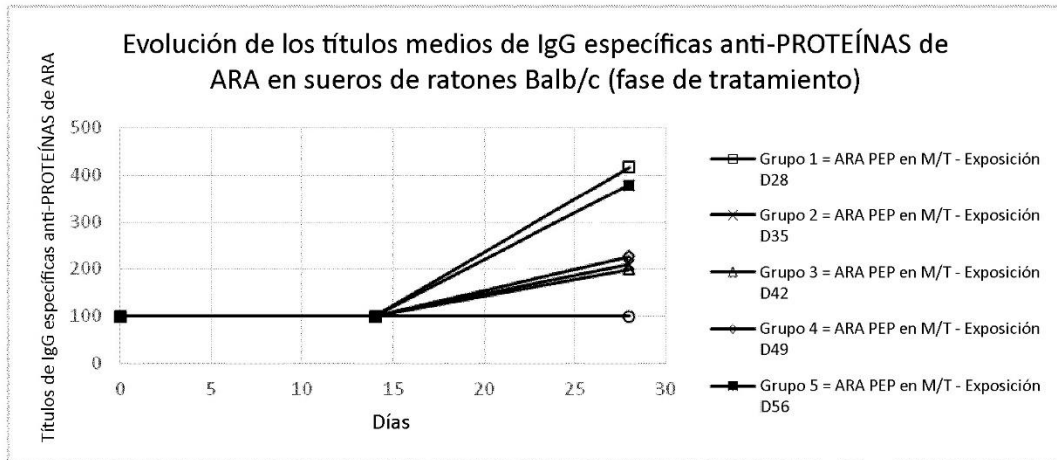


Figura 1

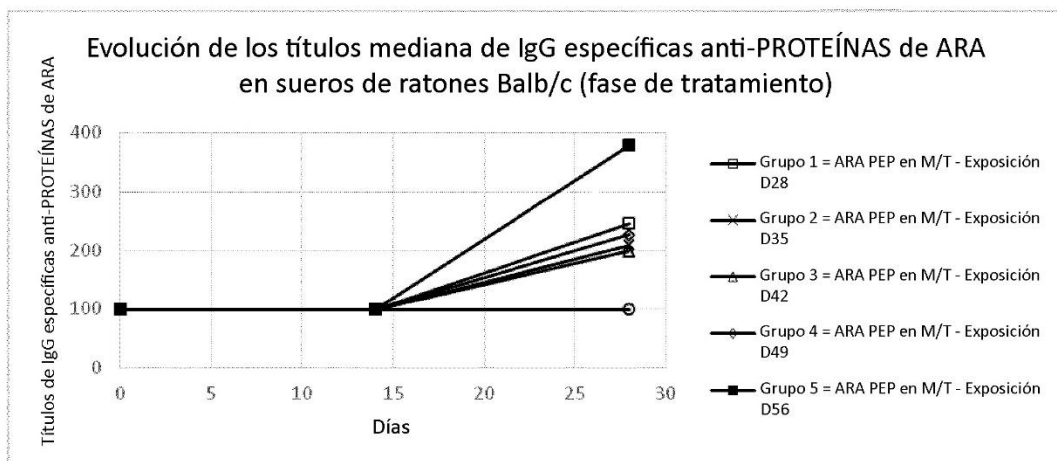


Figura 2

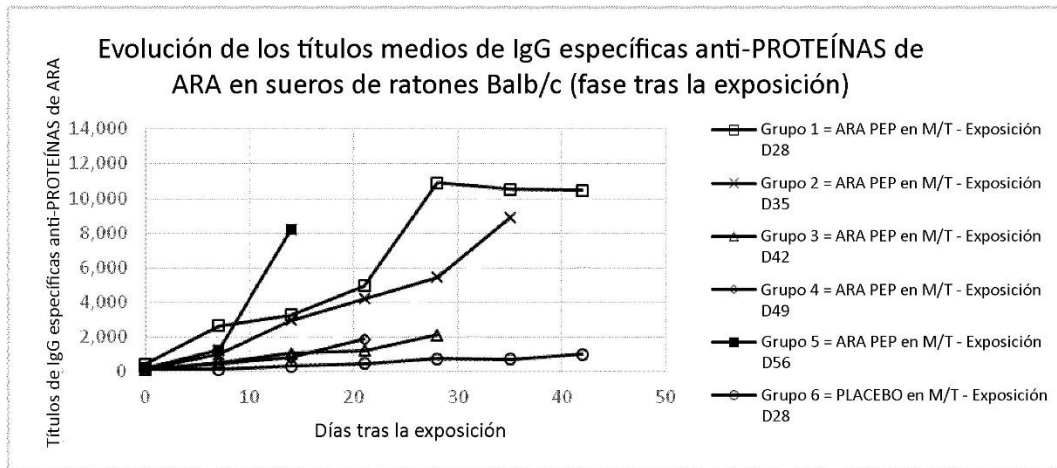


Figura 3

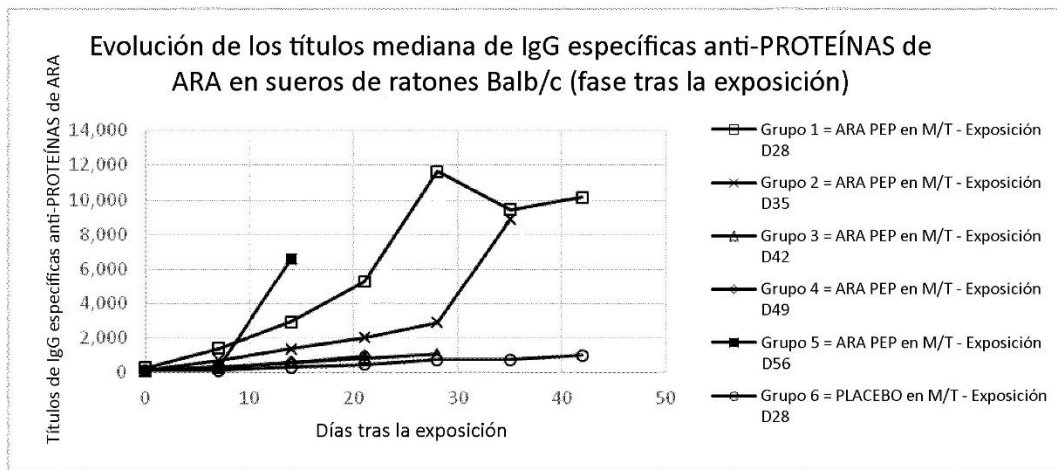


Figura 4

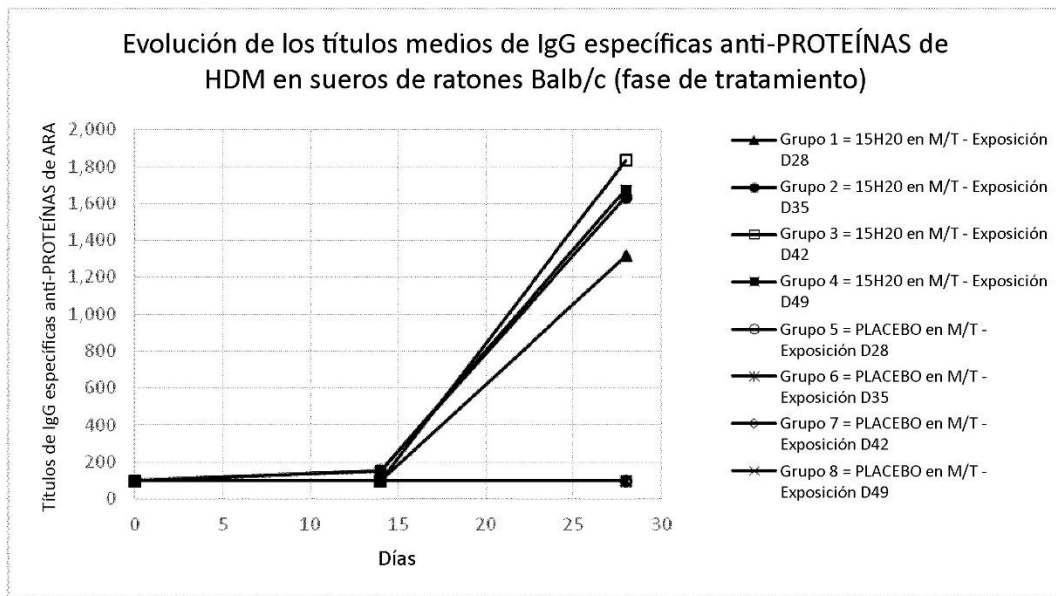


Figura 5

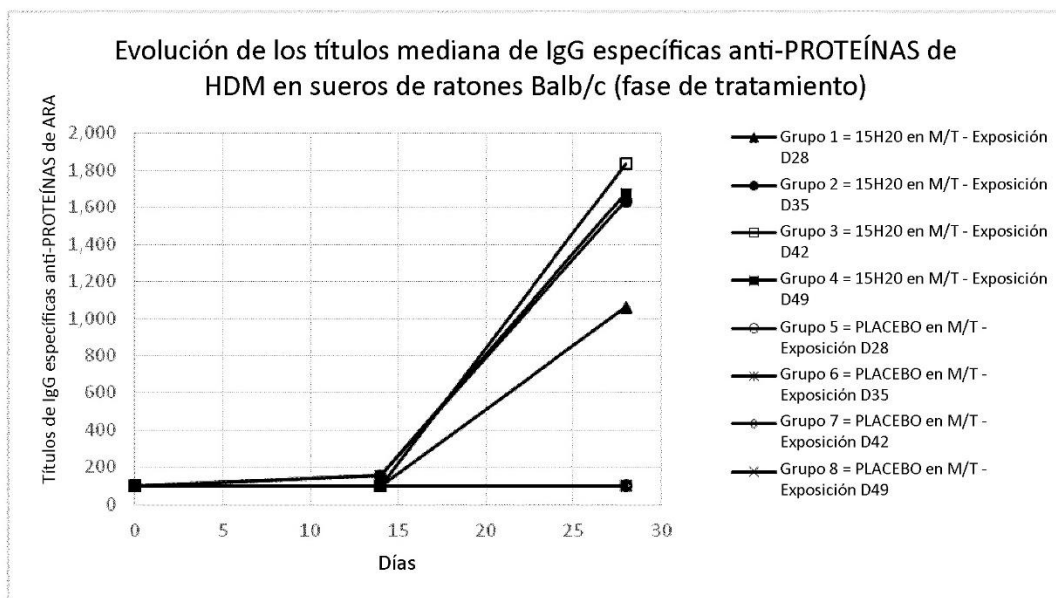


Figura 6

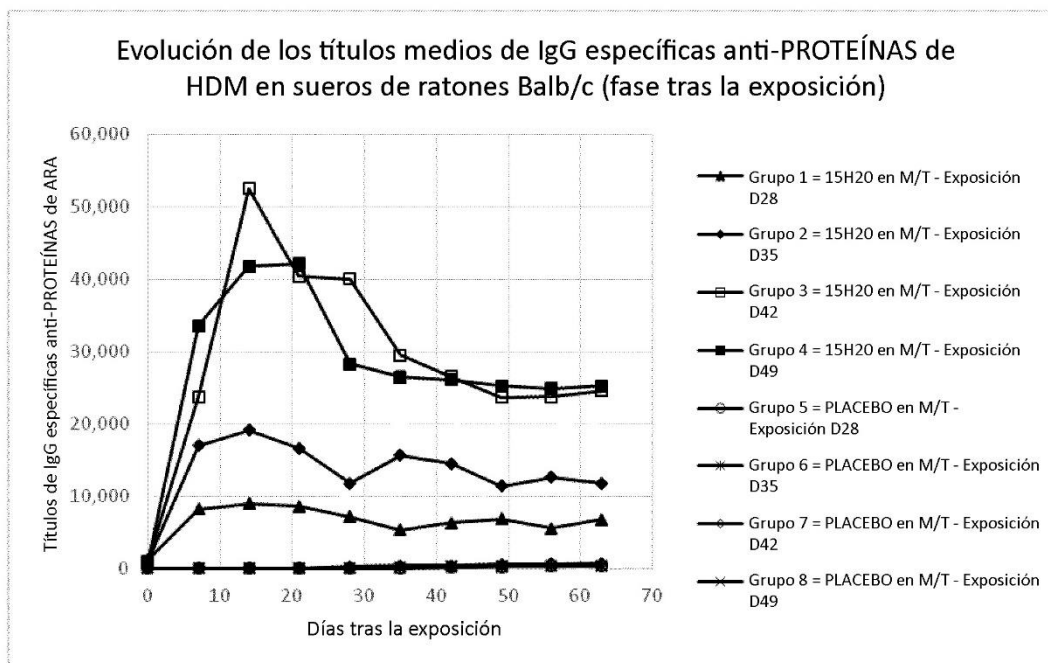


Figura 7

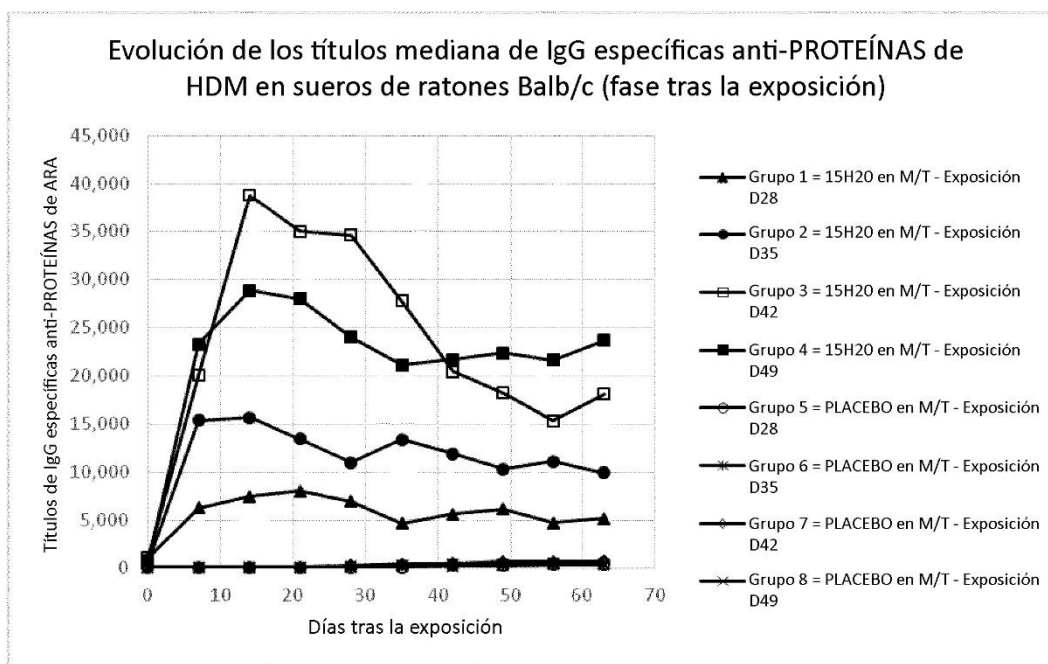


Figura 8

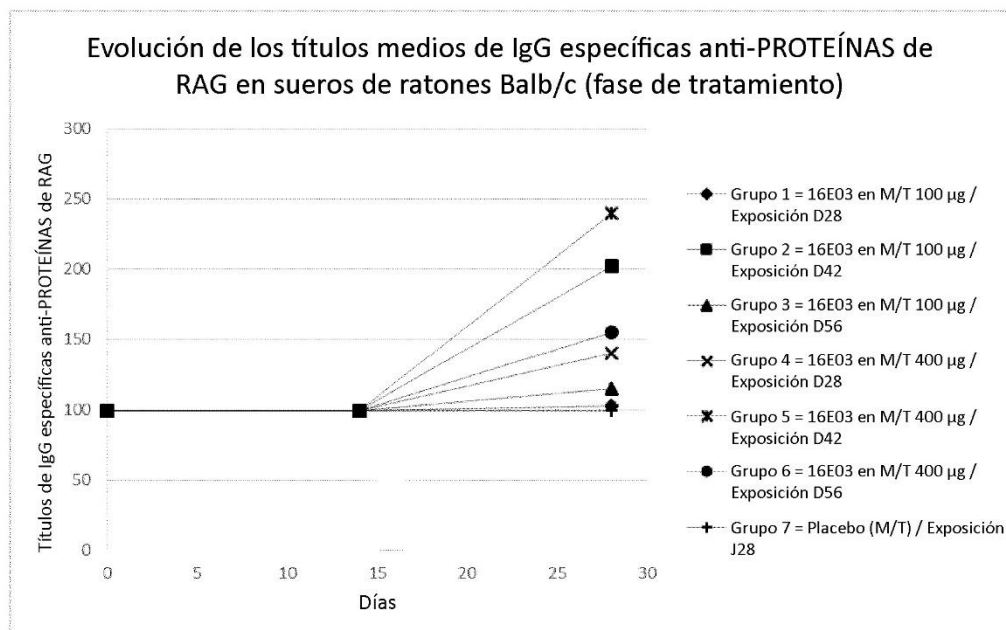


Figura 9

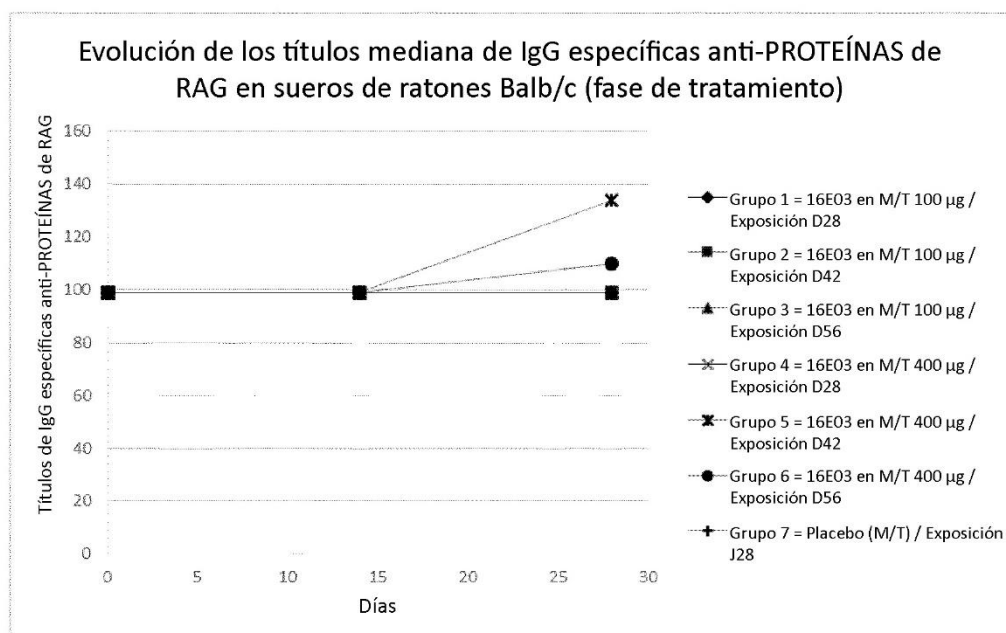


Figura 10

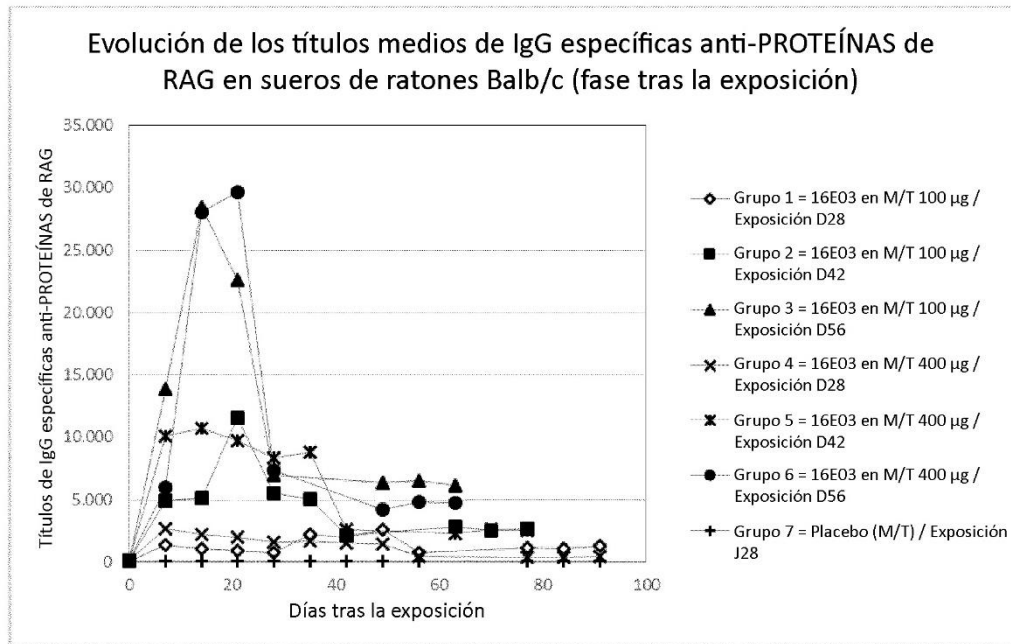


Figura 11

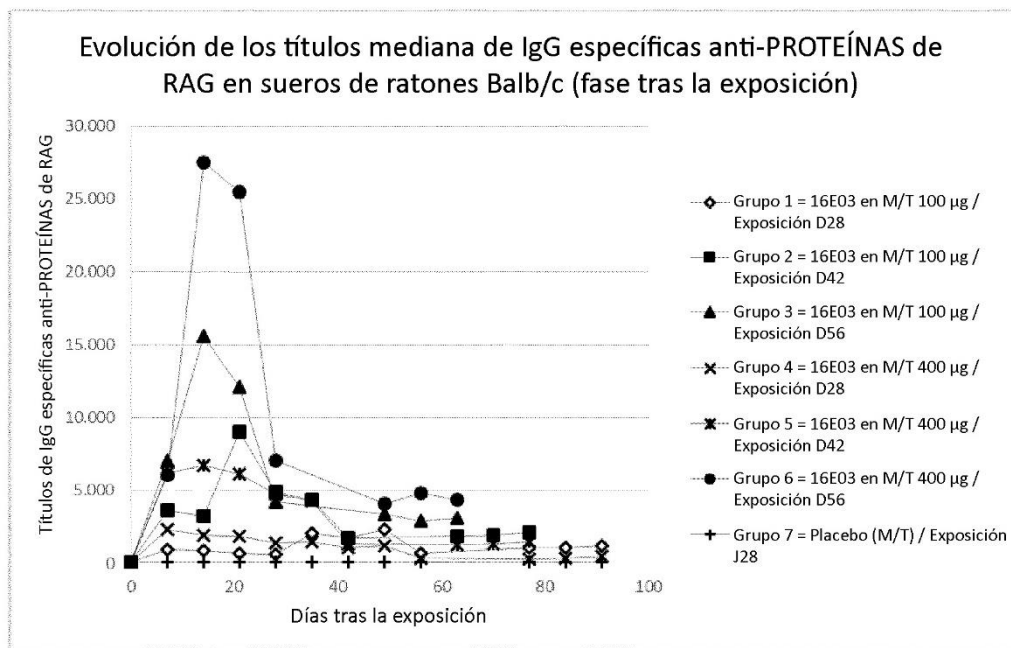


Figura 12