

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 055**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2020 PCT/EP2020/087757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2021 WO21130305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2020 E 20839094 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024 EP 4081246**

54 Título: **Composición para tratar o prevenir una alergia o reacción alérgica**

30 Prioridad:

23.12.2019 EP 19219342

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

14.10.2024

73 Titular/es:

**APOSCIENCE AG (100.0%)
Dresdner Strasse 87/A21
1200 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**ANKERSMIT, HENRIK JAN y
MILDNER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 982 055 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

Composición para tratar o prevenir una alergia o reacción alérgica

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para tratar y prevenir trastornos causados por la absorción de alérgenos en un cuerpo humano o de mamífero.

10 Antecedentes de la invención y la técnica

Durante la fase de sensibilización de las alergias, las células presentadoras de antígenos profesionales fagocitan antígenos (con respecto a las alergias, denominados alérgenos) y presentan de forma cruzada los antígenos procesados a los linfocitos T_H2. Estas células responden al encuentro con alérgenos mediante la liberación de interleucina 4 e interactúan con los linfocitos B. Las células B activadas, junto con la IL-4, producen inmunoglobulinas de tipo E (IgE) dirigidas contra el alérgeno. La IgE secretada se une a receptores específicos de IgE presentes, por ejemplo, en los mastocitos. De esta manera, estas células inmunitarias se sensibilizan al alérgeno. La reexposición provoca la unión del alérgeno a las células inmunitarias recubiertas de IgE, lo que, después del entrecruzamiento del receptor, provoca la activación de las células sensibilizadas. Los mastocitos activados responden mediante una gran liberación de mediadores inmunitarios, tales como histamina, citocinas y especies de lípidos proinflamatorios, a partir de gránulos intracelulares. Los mediadores liberados tienen efectos pleiotrópicos, que incluyen vasodilatación, secreción de moco y estimulación nerviosa, que provocan picazón y enrojecimiento. Estos síntomas pueden ser locales o sistémicos.

Los mastocitos residen predominantemente en tejidos que se enfrentan repetidamente a estímulos patógenos, como la piel, las vías respiratorias y el tracto gastrointestinal. Por lo general, los mastocitos se activan mediante señales inmunológicas, tales como receptores Fcγ entrecruzados por complejos antígeno/IgE, proteínas del sistema del complemento o agonistas de los receptores de tipo Toll. Los mastocitos responden a la activación con la gran liberación de mediadores inmunes. Los mastocitos son conocidos sobre todo por su papel en las reacciones alérgicas dependientes de IgE, y actuar sobre la función de los mastocitos, como la desgranulación, podría ayudar a aliviar la mayoría de los síntomas dolorosos asociados con las reacciones alérgicas.

El documento de Hak Sun Yu y otros: "Culture supernatant of adipose stem cells can ameliorate allergic airway inflammation via recruitment of CD4+CD25+Foxp3 T cells", STEM CELL RESEARCH & THERAPY, vol. 8, núm. 1, 23 de enero de 2017 describe que el sobrenadante de células madre adiposas cultivadas puede mejorar la inflamación alérgica de las vías respiratorias.

El documento de Baiula y otros: "Mesenchymal stem cell secretome to control inflammation in allergic conjunctivitis", Eye Sci, 1 de enero de 2015, páginas 140-142 enseña que el secretoma de las células madre mesenquimales es efectivo para controlar la inflamación en la conjuntivitis alérgica.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos y medios para prevenir o tratar reacciones alérgicas causadas por alérgenos administrados a un cuerpo humano o de mamífero.

45 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende un sobrenadante de un cultivo celular de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para su uso en el tratamiento o prevención de una alergia o una reacción alérgica causada por la administración de al menos un alérgeno alimentario y/o inhalatorio o mediante la administración sistémica de al menos un fármaco a un cuerpo humano o de mamífero, en donde las PBMC se someten a radiación ionizante antes o durante el cultivo.

Resultó sorprendente que un sobrenadante de un cultivo de PBMC puede usarse para tratar o prevenir alergias y reacciones alérgicas causadas por alérgenos alimentarios o inhalatorios que se administran a un ser humano o un mamífero. Además, la composición de la presente invención también se puede usar para tratar o prevenir alergias o reacciones alérgicas causadas por la administración sistémica de al menos un alérgeno.

Durante mucho tiempo, las terapias basadas en células madre se consideraron una herramienta prometedora para la regeneración de diversos tejidos y órganos lesionados. Desde entonces, numerosos trabajos han cuestionado este concepto al informar que los factores secretados, más que las propias células, ejercían el efecto regenerativo que se observaba. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) representan, por el contrario de las células madre, una fuente atractiva y fácilmente accesible para secretomas celulares con características versátiles. Aunque se han atribuido efectos inmunomoduladores al secretoma de las PBMC irradiadas preferentemente con y (Aposec), es sorprendente que los sobrenadantes de cultivos de PBMC muestren efectos beneficiosos con respecto a reacciones alérgicas y alergias, en particular cuando los alérgenos desencadenantes.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para tratar o prevenir una alergia o una reacción alérgica causada por la absorción de al menos un alérgeno en un cuerpo humano o de mamífero que comprende la etapa de administrar una composición como se define en la presente descripción.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para determinar la idoneidad de una composición como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento o prevención de una alergia o reacciones alérgicas causadas por la administración de al menos un alérgeno alimentario y/o inhalatorio o por la administración sistémica de al menos un fármaco a un cuerpo humano o de mamífero que comprende las etapas de

- 10 a) comparar regiones de la piel de un mamífero en contacto con un alérgeno con regiones de la piel del mismo mamífero en contacto con el alérgeno y la composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o 9,
 b) identificar una diferencia entre dichas regiones y
 c) determinar si la composición es adecuada para tratar o prevenir dicho trastorno o enfermedad.

15 Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento o diagnóstico se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia o para diagnóstico.

20 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra que MNCaposec previene la liberación del mediador inducida por el compuesto 48/80 y por IgE/anti-IgE por los mastocitos humanos primarios. Desgranulación de mastocitos evaluada mediante la liberación de beta-hexaminidasa tras la estimulación (A) con el compuesto 48/80 y (B) con IgE/anti-IgE de mastocitos humanos primarios. Los asteriscos indican $p < 0,05$ de Aposec en comparación con el medio control (CellGro). Medio de mastocitos se refiere al medio usado habitualmente para cultivar mastocitos (DMEM solo).
 La Figura 2 muestra que el secretoma Aposec de PBMC alivia la inflamación de las orejas en la hipersensibilidad inducida por DNFB. Grosor de la oreja evaluado mediante mediciones asistidas por micrómetros 24 horas después de la nueva exposición al DNFB. $p < 0,05$ Aposec vs. medio control.

30 Descripción de las modalidades

La presente invención se refiere a una composición que comprende un sobrenadante de un cultivo celular de PBMC para su uso en el tratamiento o prevención de una alergia o una reacción alérgica causada por la administración de al menos un alérgeno alimentario y/o inhalatorio o por la administración sistémica de al menos un fármaco a un cuerpo humano o de mamífero.

Se sabe que las células, en particular las células de mamíferos, secretan numerosas sustancias durante su cultivo en un medio de cultivo celular. Los medios de cultivo acondicionados así obtenidos se pueden usarse en el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades y trastornos. Por ejemplo, los documentos WO 2010/070105 y WO 2010/079086 describen medios de cultivo acondicionados ("sobrenadantes") que se obtienen mediante cultivo de PBMC y que pueden usarse en el tratamiento de diversas afecciones inflamatorias. Por lo tanto, "un sobrenadante de un cultivo celular de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier sobrenadante obtenible mediante el cultivo de PBMC *in vitro* en un medio de cultivo. Después de la etapa de cultivo, las PBMC cultivadas se retiran del medio de cultivo para obtener el sobrenadante sustancialmente libre de células, preferentemente completamente libre de células. El sobrenadante del cultivo de PBMC comprende, además de componentes del medio de cultivo, sustancias producidas y secretadas por las PBMC y/o incluso PBMC lisadas. El "sobrenadante" puede usarse de forma intercambiable con el medio de cultivo condicionado que se obtiene mediante el cultivo de PBMC.

El sobrenadante de la presente invención se puede obtener mediante el cultivo de las PBMC, que se someten a radiación ionizante antes o durante el cultivo. La radiación ionizante es preferentemente radiación gamma.

"Una alergia o una reacción alérgica causada por la administración de al menos un alérgeno alimentario y/o inhalatorio o por la administración sistémica de al menos un fármaco a un cuerpo humano o de mamífero", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier reacción adversa causada por la administración de un alérgeno alimentario y/o inhalatorio en un cuerpo humano o de un mamífero. Los alérgenos alimentarios normalmente se administran por vía oral a un cuerpo humano o de mamífero. Los alérgenos inhalatorios típicamente se administran mediante inhalación a través de la nariz o la boca hacia los pulmones y las vías respiratorias. Algunos medicamentos usados para tratar cuerpos humanos y mamíferos pueden causar reacciones alérgicas una vez que se administran sistémicamente a dichos cuerpos. Dichos fármacos se pueden administrar por vía oral, por inhalación, parenteralmente o por cualquier otra vía de administración a cuerpos humanos o de mamíferos, lo que da como resultado una distribución sistémica del fármaco dentro de dichos cuerpos. La administración parenteral de un fármaco puede incluir vías de administración intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y otras. La administración tópica de un fármaco alérgeno o de cualquier otro alérgeno en la piel no da como resultado una propagación sistémica y, por tanto, a una administración sistémica en un cuerpo humano o de mamífero.

Los alérgenos que causan alergia o reacciones alérgicas cuando se administran a un cuerpo humano o de mamífero incluyen alérgenos alimentarios, alérgenos farmacológicos, alérgenos inhalatorios (por ejemplo, polen, sustancias químicas) y todo tipo de alérgenos que se administran/introducen en un cuerpo humano o de un mamífero. Por lo tanto, las reacciones alérgicas típicas provocadas por la administración de alérgenos a un cuerpo humano o de mamífero incluyen, entre otras, secreción nasal, dificultad para respirar, náuseas, diarrea, hemorragias nasales, problemas de oído, sibilancias, tos o incluso anafilaxia, cuando el alérgeno se introduce, por ejemplo, al torrente sanguíneo.

"Alérgeno", como se usa en la presente descripción, se refiere a un antígeno que es capaz de estimular una reacción de hipersensibilidad en un cuerpo humano y/o de un mamífero a través de respuestas de inmunoglobulina E (IgE) que típicamente resultan en una liberación excesiva de histamina de los mastocitos. El término "alérgeno" incluye - si el alérgeno es de origen biológico y es una proteína o polipéptido - también fragmentos de tales alérgenos naturales cuando estos fragmentos muestran efectos similares a los del alérgeno natural con respecto a la liberación de histamina dentro de un cuerpo humano o de mamífero.

Los términos "prevenir" y "prevención", tal como se usan en la presente descripción, se refieren a la prevención o inhibición de la recurrencia, aparición y desarrollo de una alergia o de un síntoma de la misma en un cuerpo humano y de un mamífero como resultado de la administración del sobrenadante de acuerdo con la presente invención. En algunas modalidades, "prevenir" y "prevención" se refieren a la reducción del riesgo de desarrollar una alergia contra alérgenos específicos. El término "prevenir" abarca medidas no sólo para prevenir la aparición de una alergia, sino también para detener su progreso y reducir sus consecuencias una vez establecida.

Los términos "tratamiento" y "tratar", tal como se usan en la presente descripción, se refieren a la reducción o inhibición de la progresión y duración de una alergia, la reducción o mejora de la gravedad de la alergia y la mejora de uno o más síntomas de la misma. "Tratamiento" abarca también la mejora y/o reversión de los síntomas de una alergia o reacciones alérgicas. El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas. Por ejemplo, aquellos que pueden beneficiarse del tratamiento con composiciones y métodos de la presente invención incluyen aquellos que ya tienen alergia, así como también aquellos en los que se debe prevenir la alergia.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, el al menos un alérgeno es un alérgeno biológico o químico.

Los alérgenos biológicos incluyen alérgenos derivados de un sistema biológico como plantas, animales (por ejemplo, insectos, arácnidos) o microbios (por ejemplo, mohos, bacterias). Estos alérgenos son, en la mayoría de los casos, proteínas, polipéptidos o péptidos. Los alérgenos biológicos se conocen bien en la técnica y se describen en varias bases de datos como <http://www.allergen.org/> o <http://www.allergome.org/>.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, el alérgeno biológico se selecciona del grupo que consiste en un alérgeno animal, un alérgeno vegetal, un alérgeno de moho o un alérgeno bacteriano.

Los alérgenos animales son alérgenos que incluyen uno o más compuestos que se encuentran en los animales, tanto vertebrados como invertebrados. Los alérgenos de animales vertebrados que pueden estar presentes en las composiciones de alérgenos mixtos incluyen alérgenos aviares, tales como los alérgenos del huevo, por ejemplo, nGal d 1 Ovomucoide, nGal d 2 Ovoalbúmina, nGal d 3 Conalbúmina, alérgeno completo de la clara del huevo, etc.; alérgenos de mamíferos, tales como alérgenos de la leche, por ejemplo, nBos d 4 alfa-lactoalbúmina, nBos d 5 beta-lactoglobulina, nBos d 8 caseína, nBos d lactoferrina, alérgeno completo de la leche, etc.; alérgenos de pescado, por ejemplo, rCyp c 1, rGad c 1, alérgeno completo del bacalao, alérgenos del pescado blanco, alérgenos del pescado rosado, etc. Los alérgenos de animales invertebrados que pueden estar presentes en composiciones de alérgenos mixtos incluyen: alérgenos de crustáceos, tales como alérgenos del camarón, por ejemplo, tropomiosina rPen a1, alérgeno completo de camarón, etc.; alérgenos de insectos, por ejemplo, alérgeno de veneno de picadura de abeja, alérgeno de veneno de picadura de avispa, alérgeno de picadura de mosquito, etc.; y similares. Los alérgenos animales inhalados pueden incluir pelo y caspa de gato o perro, cáliz de cucaracha y excreción de ácaros del polvo.

Los alérgenos vegetales son alérgenos que incluyen uno o más compuestos que se encuentran en las plantas. Los alérgenos vegetales de interés incluyen: alérgenos de trigo, por ejemplo, rTri a 19 Omega-5 Gliadina, alérgeno completo del trigo, gliadina del trigo, rTri a 14 LTP, etc.; alérgenos del kiwi, por ejemplo, rAct d 8 PR-10, alérgeno completo del kiwi, etc.; alérgenos del apio, por ejemplo, rApi g 1.01 PR-10, rPhl p 12, alérgeno completo del apio, CCD MUXF3 de bromelina, etc.; alérgenos de la soja, por ejemplo, rGly m 4 10 PR-10, alérgeno completo de la soja, nGly m 5 Beta-conglicinina, nGly m 6 Glicinina, etc.; alérgenos de la fruta de hueso, por ejemplo, f419, f420, f421, f95, f242, o214 rPru p 1 PR-10, rPru p 3 LTP, alérgeno primario completo de la fruta de hueso, CCD MUXF3 de bromelina, etc.; alérgenos de la avena, por ejemplo, alérgenos de componentes de la avena, alérgeno completo de avena, etc.; alérgenos del sésamo, por ejemplo, alérgenos componentes de la semilla de sésamo, alérgeno completo de la semilla de sésamo, etc. Los alérgenos vegetales incluyen también los alérgenos inhalados, como los alérgenos del polen. Dichos alérgenos pueden incluir alérgenos de polen de abedul (por ejemplo, Bet v 1), alérgenos de polen de gramíneas (por ejemplo, Phl p 1), alérgenos de raigrás e hierba timotea.

Los alérgenos incluyen alérgenos aislados de fuentes naturales o alérgenos producidos de forma recombinante o química.

5 De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el cultivo celular de PBMC comprende monocitos, células T, células B y/o células NK.

10 De acuerdo con una modalidad preferida adicional de la presente invención, las PBMC se cultivan en un medio de cultivo celular que se selecciona del grupo que consiste en un medio de crecimiento celular, preferentemente medio CellGro, con mayor preferencia medio Cellgro GMP DC, RPMI, DMEM, X-vivo y Ultraculture.

15 Las PBMC del cultivo celular de PBMC se someten a radiación ionizante antes o durante el cultivo. Además de estas condiciones que inducen estrés, las PBMC pueden estar sometidas a estrés adicional. Por lo tanto, las PBMC pueden someterse a una o más condiciones adicionales que inducen estrés antes o durante el cultivo.

20 El término "bajo condiciones que inducen estrés", como se usa en la presente, se refiere a condiciones de cultivo que conducen a células estresadas. Las condiciones que causan estrés a las células incluyen, entre otras, el calor, los productos químicos, la radiación, la hipoxia, la presión osmótica, etc.

25 El estrés adicional a las células de la presente invención conduce a un aumento adicional de la expresión y secreción de sustancias beneficiosas para tratar afecciones inflamatorias de la piel, en particular afecciones de la piel asociadas con isquemia.

30 Otras condiciones que inducen estrés pueden incluir hipoxia, ozono, calor (por ejemplo, más de 2 °C, preferentemente más de 5 °C, con mayor preferencia más de 10 °C, mayor que la temperatura óptima de cultivo de las PBMC, es decir, 37 °C), radiación (por ejemplo, radiación UV, radiación gamma), productos químicos, presión osmótica (es decir, condiciones osmóticas que están elevadas al menos un 10 % en comparación con las condiciones osmóticas que se dan regularmente en un fluido corporal, en particular en la sangre) o sus combinaciones.

35 Por lo tanto, se puede seleccionar otra condición que induce estrés del grupo que consiste en radiación UV, hipoxia, ozono, calor, presión osmótica y cambio de pH.

40 De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, las PMC se someten a una radiación ionizante, preferentemente radiación gamma, a una dosis de al menos 10 Gy, preferentemente al menos 20 Gy, con mayor preferencia al menos 40 Gy, con mayor preferencia al menos 50 Gy.

45 De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, las PBMC se cultivan durante al menos 4 h, preferentemente durante al menos 6 h, con mayor preferencia durante al menos 12 h, antes de aislar su sobrenadante.

50 De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, la composición de la presente invención se administra antes, durante y/o después de la aparición de reacciones alérgicas y/o de la exposición a al menos un alérgeno.

55 La composición de la presente invención se puede administrar en diferentes etapas de la reacción alérgica o incluso antes de que ocurra la reacción. En una modalidad preferida particular de la presente invención, la composición se puede administrar antes de que el cuerpo humano o de mamífero se exponga a un alérgeno. Resulta sorprendente que la composición de la presente invención es capaz de prevenir la absorción de alérgenos o fragmentos de los mismos por las células presentadoras de antígenos. Por lo tanto, si se puede prevenir dicha absorción, el alérgeno o sus fragmentos no se presentarán al sistema inmunológico de un ser humano o mamífero.

60 De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el cultivo celular de PCBMC comprende 1×10^5 a 1×10^8 PBMC/ml, preferentemente 1×10^6 a 1×10^7 PBMC/ml, con mayor preferencia 2×10^6 a 5×10^6 PBMC/ml.

65 Resultó que la composición del sobrenadante obtenible cultivando PBMC muestra propiedades ventajosas si se cultiva cierta cantidad de PBMC por ml de medio de cultivo celular.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, de 0,1 a 5 ml de sobrenadante/kg de peso corporal, preferentemente de 0,3 a 3 ml/kg de peso corporal, con mayor preferencia de 0,5 a 2 ml/kg de peso corporal, con mayor preferencia de 0,8 a 1,2 ml/kg de peso corporal, se administra a un cuerpo humano o de mamífero.

La composición de la presente invención comprende sobrenadante en una cantidad suficiente para tratar o prevenir alergias y reacciones alérgicas. El volumen de sobrenadante que se administra por kg de peso corporal a un cuerpo humano o de mamífero como se indicó anteriormente se refiere directamente al sobrenadante. Si el volumen es demasiado grande para administrarse a un cuerpo humano o de mamífero, este volumen puede reducirse mediante,

por ejemplo, liofilización. Por tanto, el volumen de la composición de la presente invención a administrar puede ser inferior al indicado para el sobrenadante. Un experto en la técnica sabe qué volúmenes pueden administrarse mediante el uso de una vía de administración específica.

5 De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, la composición se administra por inhalación, por vía tópica, oral, sublingual, bucal, subcutánea o intravenosa.

10 La composición de la presente invención puede comprender excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes, estabilizadores, vehículos, etc. En dependencia de la forma de dosificación, la preparación de acuerdo con la presente invención comprende los ingredientes respectivos. Los métodos para preparar los mismos se conocen bien por los expertos en la técnica.

15 Para aumentar la vida útil de la composición de acuerdo con la presente invención, se puede liofilizar el sobrenadante o incluso la composición completa. Los métodos para liofilizar tales preparaciones se conocen bien por los expertos en la técnica.

Antes de su uso, la preparación liofilizada se puede poner en contacto con agua o una solución acuosa que comprende tampones, estabilizadores, sales, etc.

20 De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, el mamífero es un caballo, un perro, un gato o un camello.

25 La composición de la presente invención puede usarse para tratar cualquier tipo de mamífero. Sin embargo, los mamíferos antes mencionados son los más preferidos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar o prevenir una alergia o una reacción alérgica causada por la absorción de al menos un alérgeno en un cuerpo humano o de mamífero que comprende la etapa de administrar una composición como se define anteriormente.

30 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para determinar la idoneidad de una composición como la definida anteriormente para su uso en el tratamiento o prevención de una alergia o reacciones alérgicas causadas por la absorción de al menos un alérgeno en un cuerpo humano o de mamífero que comprende las etapas de

- 35 a) poner en contacto al menos dos regiones de la piel de un mamífero con un alérgeno,
b) administrar una composición como la definida anteriormente a al menos una de dichas regiones de la piel, en donde al menos una de dichas regiones de la piel no se trata con dicha composición,
c) comparar las regiones de la piel en contacto con el alérgeno con las regiones de la piel en contacto con el alérgeno y dicha composición,
40 d) identificar una diferencia entre dichas regiones y
e) determinar si la composición es adecuada para tratar o prevenir dicho trastorno o enfermedad.

45 Para probar si la composición de la presente invención puede usarse para tratar o prevenir una alergia o una reacción alérgica causada por la administración de al menos un alérgeno alimentario y/o inhalatorio, o por la administración sistémica de al menos un fármaco a un cuerpo humano o de mamífero, puede usarse un ensayo de raspado. Si la composición de la presente invención es capaz de reducir las reacciones alérgicas del sitio del raspado en comparación con un sitio de raspado no tratado o un sitio de raspado tratado con una composición de control negativo, la composición de la presente invención puede administrarse a un cuerpo humano o de mamífero en necesidad de ello.

50 Ejemplos

Ejemplo 1: Desgranulación de mastocitos alterada por Aposec

55 Materiales y métodos

Fabricar Aposec

60 Se produjeron secretomas de PBMC ("Aposec") como se describe en Wagner T y otros. (Sci Rep. 2018;8(1):18016). Brevemente, las PBMC se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente de densidad asistida por Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, EE.UU.) y se ajustaron a una concentración de $2,5 \times 10^7$ células/ml. Subsecuentemente, las células se expusieron a 60 Gy de irradiación y con Cesio 137 (IBL 437C, Isotopen Diagnostik CIS GmbH, Alemania) y se cultivaron en medio CellGenix GMP DC sin rojo de fenol (CellGenix GmbH, Alemania) durante 24 ± 2 horas. Las células y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación y el sobrenadante se pasó a través de un filtro de $0,2 \mu\text{m}$. La eliminación viral se realizó mediante el uso de la tecnología Theraflex de azul de metileno (MacoPharma, Francia) y mediante irradiación y del polvo liofilizado (25 000 Gy, Gammatro 1500, Mediscan, Austria)

como se describió anteriormente (Haider T y otros. Exp Neurol. 2015;267:230-42). El liofilizado estéril se criopreservó habitualmente a -80 °C.

5 Aislamiento y mantenimiento *in vitro* de mastocitos humanos primarios

La piel y los tejidos grasos subcutáneos usados para el aislamiento de mastocitos se obtuvieron de pacientes sometidos a abdominoplastia. Se eliminaron el tejido subcutáneo y la dermis reticular y los tejidos restantes se cortaron en trozos pequeños y se sometieron a digestión enzimática (2,4 U/ml de dispasa II de *Bacillus polymyxa*, Roche, Suiza) a 4 °C durante toda la noche. Después de la eliminación de la epidermis, los tejidos dérmicos se digirieron en colagenasa I (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) a 37 °C durante 2 horas. Los mastocitos CD117⁺ se enriquecieron mediante la tecnología de clasificación celular magnética (MACS System, Miltenyi Biotec, Alemania) de acuerdo con lo sugerido por el fabricante. Para aumentar la pureza de las células aisladas, el procedimiento de aislamiento se repitió una vez más mediante el uso de células CD117⁺ del primer aislamiento. Los mastocitos CD117⁺ se cultivaron en DMEM suplementado con un 10 % (vol/vol) de suero fetal de ternera inactivado por calor (ambos Gibco), 1 % (vol/vol) de penicilina/estreptomina (Biochrom, Alemania) y 100 ng/ml de factor de células madre humano recombinantes (PeproTech, EE.UU.).

Desgranulación de mastocitos humanos primarios inducida por el compuesto 48/80

20 Se sembraron mastocitos humanos primarios a una densidad de 50 000 a 100 000 por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano en 50 µl de DMEM sin indicador de pH coloreado suplementado con suero y SCF como se describió anteriormente. Las células se trataron previamente con 50 µl de Aposec o 50 µl de medio control (CellGenix) durante toda la noche. Al día siguiente, las células se lavaron cuidadosamente con 100 µl de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico; Thermo Fisher Scientific) y se indujo la desgranulación mediante la adición de 100 µl de HEPES que contenía 50 pg/ml del compuesto 48/ 80 (Sigma Aldrich, EE.UU.). Para los controles no estimulados, se añadió HEPES. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con ambiente normal de CO₂. Se separaron y conservaron cincuenta µl de sobrenadante y las células se lisaron en 100 µl de Tritón X-100 al 0,1 % (Sigma Aldrich).

30 Desgranulación de mastocitos humanos primarios inducida por IgE/anti-IgE

Se sembraron mastocitos humanos primarios a una densidad de 50 000 a 100 000 por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano en 50 µl de DMEM sin indicador de pH coloreado suplementado con suero y SCF como se describió anteriormente. Las células se trataron previamente con 50 µl de Aposec, 50 µl de medio control (CellGenix) o 50 µl de DMEM (medio de mastocitos) y adicionalmente se estimularon con 100 ng/ml de IgE humana (mieloma, Merck KGaA, Alemania) durante toda la noche. Al día siguiente, las células se lavaron cuidadosamente con 100 µl de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico; Thermo Fisher Scientific) y se indujo la desgranulación mediante la adición de 100 µl de HEPES que contenía 5 µg/ml de anticuerpo anti-IgE (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., EE.UU.). Para los controles no estimulados, se añadió HEPES. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con ambiente normal de CO₂. Se separaron y conservaron cincuenta µl de sobrenadante y las células se lisaron en 100 µl de Tritón X-100 al 0,1 % (Sigma Aldrich).

Reactivos para el ensayo de beta-hexosaminidasa

45 La solución de sustrato para el ensayo de beta-hexosaminidasa se preparó mediante la disolución de 8,9 g de hidrogenofosfato disódico dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O) y 650 mg de p-nitro-N-acetil-beta-D-glucosamida en 400 ml de agua bidestilada y ajustando el pH a 4,5 con ácido cítrico 0,4 M (todos los reactivos Sigma Aldrich). La solución de parada consiste en 15,02 g de glicina en 900 ml de agua bidestilada con un pH ajustado a 10,7 mediante el uso de hidróxido de sodio 3 M.

50 Ensayo de beta-hexosaminidasa

Se añadieron cincuenta µl de solución de sustrato a 50 µl de sobrenadantes y 50 µl de células lisadas con tritón, respectivamente, y las muestras se incubaron a 37 °C con ambiente de CO₂ durante 90 minutos. Se añadieron setenta y cinco µl de tampón de parada y se determinó la densidad óptica a 405 nm mediante el luminómetro de lectura de placas LUMIstar OPTIMA Reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania) mediante el uso del software FluUOstar OPTIMA (versión 1.20-0, BMG LABTECH).

60 Datos y análisis estadísticos

El porcentaje de beta-hexosaminidasa liberada se calcula mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{2 \times \text{enzima en el sobrenadante}}{1/2 \times \text{enzima en el sobrenadante} + 4 \times \text{enzima en el lisado celular}} \times 100$$

Los datos se presentan como medias aritméticas de réplicas técnicas y error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de una cola comparando los dos grupos Aposec frente al medio control con $p < 0,05$ considerado estadísticamente significativo.

5 Resultados

Aposec anula la desgranulación forzada de los mastocitos

Para determinar si Aposec es capaz de prevenir la desgranulación de los mastocitos, los mastocitos se trataron previamente con Aposec o medio control y se evaluó la liberación de beta-hexosaminidasa de los mastocitos humanos primarios después de la estimulación con el compuesto 48/80 e IgE/anti-IgE. Aposec impidió notablemente la liberación de mediadores inducida por el compuesto 48/80 así como también la inducida por IgE/anti-IgE, en comparación con el medio control (27,9 + 3,6 % y 27,3 + 1,1 % liberaron β -hexaminidasa con Aposec frente a 35,7 \pm 3,4 % y 36,7 + 3,1 % de mediadores liberados con el medio control, después del estímulo con el compuesto 48/80 y con IgE/anti-IgE, respectivamente, ambos $p < 0,05$ aposec vs. control) (Figura 1). En comparación, el medio control no mostró ningún efecto sobre la desgranulación de los mastocitos en comparación con el medio de mastocitos [36,7 \pm 2,3 y 36,9 \pm 1,9 mediador liberado con medio de mastocitos después de la estimulación con el compuesto 48/80 y con IgE/anti-IgE, respectivamente. $p > 0,05$ medio de mastocitos frente al medio control en (A) y (B)].

20 Conclusión

Los datos presentes demuestran que Aposec previene eficazmente la liberación de mediadores por mastocitos humanos primarios cuando se estimulan con el compuesto 48/80 e IgE/anti-IgE. Mientras que la liberación de enzimas se redujo en más de un 20 % después de la estimulación química, la liberación de beta-hexosaminidasa después del tratamiento con IgE/anti-IgE disminuyó en más de un 25 % con Aposec en comparación con el medio control. En conjunto, estos datos sugieren el uso de Aposec para el tratamiento de reacciones alérgicas mediadas por la desgranulación de mastocitos.

Ejemplo 2: Alivio de los síntomas de la hipersensibilidad alérgica mediante la aplicación de Aposec *in vivo*

30 Antecedentes

En las últimas décadas, una extensa investigación sobre la patología de la hipersensibilidad alérgica ha contribuido a una mejor comprensión de las reacciones inmunológicas. Sin embargo, la compleja y multifacética etiología de la enfermedad representa un obstáculo importante para el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas efectivas y las opciones de tratamiento clínico siguen siendo limitadas hasta la fecha. Dado los potentes efectos antiinflamatorios de Aposec que se describieron anteriormente, se examinó el potencial de Aposec para aliviar los síntomas relacionados con la hipersensibilidad alérgica.

40 Materiales y métodos

Modelo de ratón

El 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DNFB, Sigma-Aldrich) sirvió como alérgeno para inducir condiciones inflamatorias en ratones C57BL/6. Se administraron veinte μ l de DNFB al 0,25 % (vol/vol) en aceite de oliva los días 0 y 1. Las orejas se trataron diariamente con Aposec, mientras que las orejas contralaterales recibieron medio vehículo durante 6 días consecutivos a partir del día 0.

50 Medidas micrométricas

Veinticuatro horas después de la nueva exposición al DNFB, se evaluó el grosor de la oreja mediante el uso de un micrómetro digital electrónico (0-25 mm, Marathon Management Inc, EE.UU.), midiendo el grosor de los dos tercios externos de la oreja. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

55 Análisis estadístico

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante el uso del software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.). Se realizó una prueba t pareada de una cola para comparar Aposec frente al medio control; los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se presentan como medias aritméticas de réplicas biológicas y error estándar de la media.

60 Resultados

Aposec mitiga la inflamación del tejido inducida por alérgenos

La hipersensibilidad murina inducida por DNFB se usó como modelo para estudiar los efectos antiinflamatorios de

5 Aposec en reacciones alérgicas *in vivo*. El grado de inflamación de las orejas, que refleja la gravedad de la respuesta inmunitaria, se redujo notablemente con Aposec en comparación con el medio control 24 horas después de una nueva exposición a DNFB ($553,9 \pm 12,7 \mu\text{m}$ de grosor de las orejas tratadas con vehículo frente a $472,4 \pm 47,3 \mu\text{m}$ con Aposec, $p < 0,05$ Aposec frente a medio control. Orejas sin exposición: $355 \pm 12,7 \mu\text{m}$ de grosor) (Figura 2).

Conclusión

10 Estos datos muestran que la aplicación de Aposec previno eficazmente la inflamación del tejido después de una nueva exposición al alérgeno. Estos hallazgos indican que Aposec representa un candidato prometedor para el tratamiento de los síntomas relacionados con reacciones alérgicas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un sobrenadante de un cultivo celular de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para su uso en el tratamiento o prevención de una alergia o una reacción alérgica causada por la administración de al menos un alérgeno alimentario y/o inhalatorio o por la administración sistémica de al menos al menos un fármaco en un cuerpo humano o de mamífero, en donde las PBMC se someten a radiación ionizante antes o durante el cultivo.
- 10 2. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos un alérgeno es un alérgeno biológico o químico.
3. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el alérgeno biológico se selecciona del grupo que consiste en un alérgeno animal, un alérgeno vegetal, un alérgeno de moho o un alérgeno bacteriano.
- 15 4. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cultivo celular de PBMC comprende monocitos, células T, células B y/o células NK.
- 20 5. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las PBMC se cultivan en un medio de cultivo celular seleccionado de un medio de crecimiento celular.
6. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las PMC se someten a una radiación ionizante a una dosis de al menos 10 Gy, preferentemente al menos 20 Gy, con mayor preferencia al menos 40 Gy, con mayor preferencia al menos 50 Gy.
- 25 7. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las PBMC se cultivan durante al menos 4 h, preferentemente durante al menos 6 h, con mayor preferencia durante al menos 12 h, antes de aislar su sobrenadante.
- 30 8. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición se administra antes, durante y/o después de la aparición de reacciones alérgicas y/o exposición a al menos un alérgeno.
- 35 9. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el cultivo celular de PCBMC comprende 1×10^5 a 1×10^8 PBMC/ml, preferentemente 1×10^6 a 1×10^7 PBMC/ml, con mayor preferencia 2×10^6 a 5×10^6 PBMC/ml.
- 40 10. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde de 0,1 a 5 ml de sobrenadante/kg de peso corporal, preferentemente de 0,3 a 3 ml/kg de peso corporal, con mayor preferencia de 0,5 a 2 ml/kg de peso corporal, con mayor preferencia de 0,8 a 1,2 ml/kg de peso corporal, se administra a un cuerpo humano o de mamífero.
- 45 11. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la composición se administra por inhalación, por vía tópica, oral, sublingual, bucal, subcutánea o intravenosa.
- 50 12. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el mamífero es un caballo, un perro, un gato o un camello.
- 55 13. Un método para determinar la idoneidad de una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 9 para su uso en el tratamiento o prevención de una alergia o reacciones alérgicas causadas por la administración de al menos un alérgeno alimentario y/o inhalatorio o mediante la administración sistémica de al menos un fármaco a un cuerpo humano o de mamífero que comprende las etapas de
 - a) comparar regiones de la piel de un mamífero en contacto con un alérgeno con regiones de la piel del mismo mamífero en contacto con el alérgeno y la composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o 9,
 - b) identificar una diferencia entre dichas regiones y
 - c) determinar si la composición es adecuada para tratar o prevenir dicho trastorno o enfermedad.

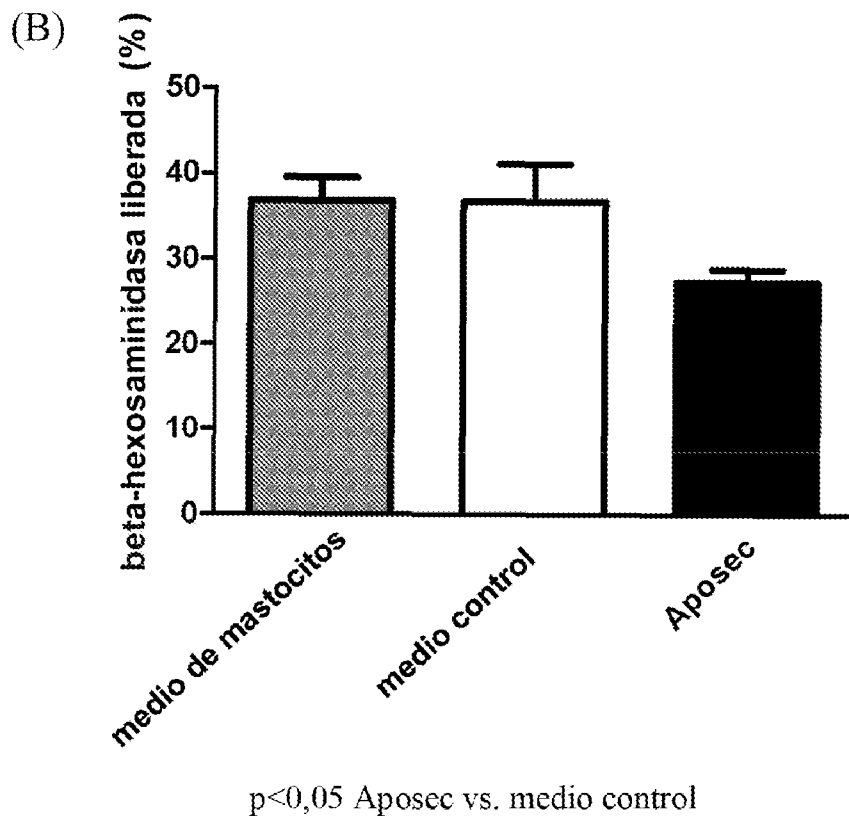
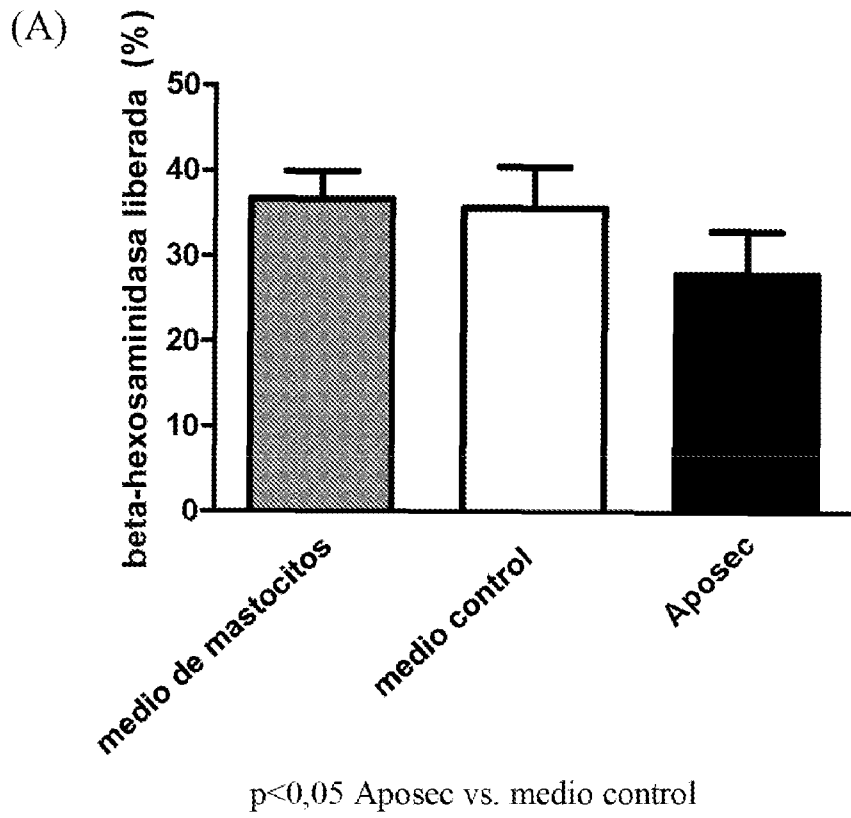


Figura 1

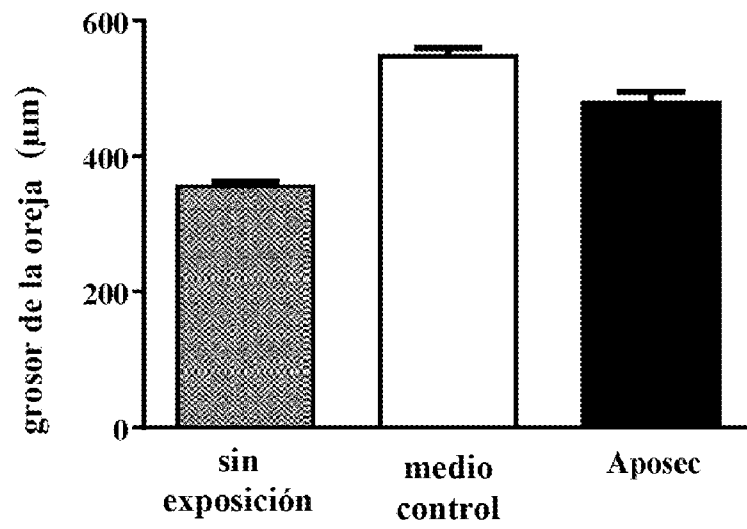


Figura 2