(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 281 447**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/35 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **01977471 .0**
(86) Fecha de presentación : **05.10.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1322330**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

(54) Título: **Modulación de respuesta alérgica.**

(30) Prioridad: **05.10.2000 US 237724 P**
13.03.2001 US 804464

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

(73) Titular/es: **Mannkind Corporation**
28903 North Avenue Paine
Valencia, California 91355, US
University of Zurich

(72) Inventor/es: **Kundig, Thomas, M. y**
McCormack, Stephen, J.

(74) Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Modulación de respuesta alérgica.

Campo técnico de la invención

Esta invención se refiere al campo de las vacunas y tratamientos frente a la alergia. Más en particular, la invención se refiere a un procedimiento de suministro de alérgenos.

Antecedentes

Una alergia es el resultado de una potente reacción del sistema inmune frente a una sustancia que normalmente debería ser inofensiva para el hospedador. Una reciente encuesta del colegio americano de alergia, asma e inmunología (ACAAI) revela que aproximadamente el 38% de la población de los EE.UU. sufre alergias (*Immunotherapy Weekly*, 29 de noviembre de 1999). Si la estimación del ACAAI es correcta, al menos 85 millones de americanos tienen alergias.

Las alergias están causadas por un desequilibrio o hipersensibilidad del sistema inmune, que lleva a una respuesta inmune mal dirigida. Una respuesta alérgica tiene lugar cuando el sistema inmune reacciona de forma inadecuada frente a agentes muy específicos que en la mayoría de las personas no causan una respuesta inmune, tal como pólenes de árboles y césped, cucarachas, ácaros del polvo, escamas de animales, látex o venenos de picadura de abeja, avispa y hormiga roja. Otros alérgenos comunes incluyen alimentos tales como cacahuetes, frutos secos, leche, pescado, marisco, huevos, soja, trigo, miel, melón, fresas y frutas tropicales, fármacos tales como penicilina, anestésicos, suero, algunos virus, bacterias y protozoos y moho. Pueden darse reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado en respuesta al urushiol, un aceite encontrado en la hiedra venenosa, en el roble venenoso y en el zumaque, dando lugar a un exantema con irritación grave y la formación de ampollas con exudado.

En los siguientes artículos, *inter alia*, se describen alérgenos: Blaauw PJ, Smithuis OL, Elbers AR. The value of an in-hospital insect sting challenge as a criterion for application or omission of venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 98: 39-47; Bousquet, J, Lockey, RF, Malling, H-J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases [Artículo de opinión de la OMS]. *World Health Organization, Allergy*. 1998; 53 (supl): 12-16; Lack G, Nelson HS, Amran D, y col. Rush immunotherapy results in allergen-specific alterations in lymphocyte function and interferon-γ production in CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99: 530-538; Müller U. Diagnosis and treatment of insect sting sensitivity. *J. Asthma. Res*. 1966; 3: 331-333; Weber, RW. Immunotherapy with allergens. *JAMA*. 1997; 278: 1881-1887.

La primera exposición a un alérgeno eficaz causa sólo una respuesta inmune leve que sensibiliza al sistema inmune a la sustancia. Sin embargo, las exposiciones posteriores al alérgeno dan lugar a síntomas alérgicos, típicamente en forma dependiente de dosis (es decir, el alérgeno deberá alcanzar un cierto umbral) y pueden causar una respuesta grave creciente con exposiciones repetidas. Los síntomas alérgicos incluyen picor e hinchazón de los tejidos afectados, exantemas, espasmos musculares y otros síntomas más graves. *Véase la Tabla 1* a continuación de la clasificación de Müller de reacciones alérgicas. El tipo de síntoma depende del alérgeno específico, de la parte del organismo donde se da la exposición y del grado de sensibilización del individuo. Los alérgenos que se inhalan a menudo causan congestión, picor de nariz y de garganta, y producción de moco. En individuos muy alérgicos o con dosis mayores de alérgeno, pueden darse estornudos, sibilancias o síntomas similares. Por el contrario, la ingestión de alérgenos causa picor de garganta, vómitos, retortijones de estómago, diarrea y exantemas cutáneos o choque alérgico, en casos de fuerte sensibilidad. El eccema también se asocia con alergias; un descenso de las alergias da lugar a una mejora del eccema.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Clasificación de reacciones alérgicas de Müller

Reacciones locales extensas	*Hinchazón en el lugar del pinchazo con diámetro >10 cm, permanece >24h*
Reacciones sistémicas	
Grado I:	Urticaria generalizada, picor, malestar, ansiedad
Grado II:	Cualquiera de los anteriores más 2 de los siguientes: angioedema (también de grado II si aparece aislado), opresión en el pecho, nauseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, mareos
Grado III:	Cualquiera de los anteriores mas 2 o más de los siguientes: disnea, sibilancias, estridor (también de grado III sólo con uno cualquiera de estos), disfagia, disartria, ronquera, debilidad, confusión.
Grado IV:	Cualquier de los anteriores más 2 o más de los siguientes: caída de la presión sanguínea, colapso, pérdida de consciencia, incontinencia (orina, heces), cianosis.

La mayoría de las personas que sufren alergia, aproximadamente 45 millones de americanos, son los alérgicos al polen y sufren enfermedades de las vías respiratorias, tales como rinitis alérgica, alergia al polen y asma. Las personas con alergias estacionales al polen a menudo desarrollan sensibilidad cruzada a otros alérgenos que se presentan todo el año, tales como ácaros del polvo. Las personas con alergias respiratorias crónicas a menudo desarrollan asma, que es la consecuencia de la activación prolongada de la respuesta alérgica y/o inflamatoria en el sistema respiratorio. Los síntomas del asma incluyen estornudos, sibilancia y falta de aire debido al estrechamiento de los conductos bronquiales, exceso de producción de moco e inflamación. El asma puede ser discapacitante y en ocasiones mortal.

La alergia a las cucarachas es una alergia a los excrementos de las cucarachas y es un desencadenante de ataques asmáticos. La alergia a los ácaros del polvo es una alergia a los excrementos de un microorganismo que vive en el polvo que se encuentra en las viviendas o en los lugares de trabajo y, prácticamente, en toda la ropa de cama. Los ácaros del polvo son quizás la causa más común de rinitis alérgica crónica, que produce síntomas similares a la alergia al polen y asma. Aproximadamente la mitad de las personas que padecen alergia son alérgicos a los ácaros del polvo.

Aproximadamente 10 millones de americanos son alérgicos a animales. Las mascotas domésticas son la fuente más común de estas reacciones. Muchas personas piensan que el pelo de gatos y perros provoca las alergias a las mascotas. Sin embargo, los principales alérgenos son proteínas secretadas por las glándulas sebáceas de la piel de los animales que se depositan en las escamas, y en la saliva, que se pega al pelo cuando el animal se lame. Cuando la saliva que lleva las proteínas se seca, las proteínas se distribuyen a través del aire y son inhaladas por las personas. Algunos roedores, tales como las cobayas y los jerbos, se han vuelto más populares como mascotas domésticas. Estos también, al igual que ratones y ratas, pueden causar reacciones alérgicas en algunas personas.

Entre 6 y 7 millones de americanos se ven afectados por alergias a alimentos. Las alergias a alimentos son diferentes a las intolerancias a alimentos, ya que las intolerancias a alimentos no afectan al sistema inmune. Hasta 3 millones de americanos son muy alérgicos a cacahuetes y a frutos secos. Ocho alimentos son responsables del 90% de las alergias a alimentos: leche, pescado, cacahuetes, frutos secos, huevos, soja, trigo y marisco. En estos casos, la reacciones sistémicas puede ser graves, tales como la aparición de choques alérgicos. Para evitar consecuencias graves que incluyen la muerte, las personas alérgicas a alimentos llevan antihistamínicos potentes. Aun así, las medidas de tratamiento o preventivas para las alergias a alimentos a menudo son sólo marginalmente eficaces. La terapia principal simplemente es evitar por completo el alérgeno específico. Las inyecciones para la alergia subcutáneas convencionales no son eficaces frente a las alergias a alimentos.

Aproximadamente 5 millones de personas en los Estados Unidos son alérgicas a la picadura de abejas o avispas, en muchos casos con síntomas potencialmente mortales. Tres de cada 5 personas alérgicas picadas experimentarán una reacción grave si vuelven a ser picadas de nuevo.

En los países desarrollados, la frecuencia de reacciones alérgicas ha aumentado drásticamente durante los últimos años, hasta el punto de que aproximadamente el 20% o más de la población de los Estados Unidos tiene alergias a alguna sustancia normal. En conjunto, las enfermedades alérgicas son la 6ª causa en importancia de enfermedades crónicas en los Estados Unidos. La herencia, condiciones ambientales, tipo y número de exposiciones y diversos factores fisiológicos, tales como el estrés, la fatiga y la preocupación emocional, pueden aumentar la sensibilidad del sistema inmune y predisponer a una persona a las alergias.

La razón del aumento en el número de personas que padecen alergia está actualmente bajo un intenso debate científico. Hay varias posibles explicaciones con las que la mayoría de los científicos pueden estar de acuerdo. La contaminación ambiental con óxidos nítricos (NOx) puede tener un papel importante en el aumento de la frecuencia de enfermedades alérgicas de las vías respiratorias. No sólo los óxidos nítricos aumentan la producción de proteínas alergénicas en el polen, sino que también pueden dañar directamente las células sensibles que recubren las vías respiratorias de la garganta y los pulmones. Este daño tiene el efecto de permitir que accedan al organismo más alérgenos a través de las células dañadas que normalmente actúan como un revestimiento protector. El problema empeora cuando partículas de humo se adsorben al polen y actúan como un adyuvante, potenciando los efectos de los alérgenos.

Muchos científicos creen que un fenómeno conocido como reactividad cruzada también puede ser la causa del aumento del problema de la alergia. La reactividad cruzada tiene lugar cuando una persona, expuesta a un alérgeno en particular, tiene en consecuencia un aumento de sensibilización a otro tipo de alérgeno similar. Normalmente se ha encontrado que las alergias a alimentos se asocian con enfermedades alérgicas de las vías respiratorias. Por ejemplo, si se inhala el polen de avellano, una persona puede desarrollar una alergia a las avellanas. La reactividad cruzada entre alérgenos del polen y alérgenos encontrados en los alimentos puede ser de hecho, una de las principales causas de alergias a los alimentos en adultos.

Además, los científicos consideran que las campañas de vacunación a gran escala y el uso ampliamente extendido de antibióticos durante las últimas décadas, que ha reducido drásticamente la gravedad de las enfermedades infecciosas, también puede haber alterado el sistema inmune de la población, haciendo que las personas sean más susceptibles a las alergias. Aunque la medicina moderna y las vacunas han reducido la carga de las enfermedades infecciosas, una posible compensación puede ser el aumento de la prevalencia de alergias.

A la vista de la escalada social y el impacto económico de las alergias, afrontar las enfermedades alérgicas se ha convertido en un empeño médico de importancia creciente. Los médicos usan tres aproximaciones generales para ayudar a las personas con sus alergias: advierten a sus pacientes sobre medios para evitar lo más posible los alérgenos, prescriben medicamentos para aliviar los síntomas alérgicos y administran una serie de inyecciones para la alergia. Hoy existen varios fármacos potentes contra la alergia. Sin embargo, estos fármacos simplemente tratan los síntomas de las alergias y algunos de ellos son portadores del riesgo de efectos adversos graves. Otra estrategia es desarrollar maneras de acondicionar el sistema inmune para que responda "apropiadamente" a los alérgenos. Sólo esta última aproximación, las inyecciones para la alergia o inmunoterapia es un tratamiento etiológico para las alergias.

La inmunoterapia con alérgenos o hiposensibilización es la práctica de administrar gradualmente cantidades crecientes de un alérgeno a un sujeto alérgico para mejorar los síntomas (reacciones alérgicas) asociados con la exposición posterior al alérgeno etiológico. La inmunoterapia con alérgenos se introdujo en 1911 para tratar la "polinosis" y actualmente se ha establecido como el tratamiento de referencia en el caso de alergias graves.

Se ha demostrado que las inyecciones para la alergia son útiles en muchos casos ya que alivian de forma significativa y permanente el grado de sufrimiento experimentado por los individuos alérgicos. De hecho, la aproximación actual de inyecciones para la alergia es el único procedimiento que puede observarse como un medio curativo para revertir esta enfermedad. También se ha demostrado que la desensibilización precoz a alérgenos específicos usando la aproximación de inyecciones para la alergia es eficaz de algún modo frente a la aparición de alergias cruzadas a otras sustancias. Por ejemplo, un paciente que recibe inyecciones para la alergia para tratar la fiebre del heno mediante una desensibilización frente al polen tiene una disminución del riesgo de volverse alérgico al pelo de gato o a otros alérgenos comunes.

Aunque las inyecciones para la alergia son actualmente el único medio para tratar la enfermedad más que los síntomas, hay desventajas obvias para este tratamiento según se realiza hoy en día. La inmunoterapia convencional es prolongada, necesita de 2 a 5 años, cara y sólo ligeramente eficaz. Este tratamiento no es eficaz en una tercera parte de todas las personas que padecen alergia y es sólo temporalmente eficaz en otro tercio de los individuos alérgicos. La inmunoterapia tiene eficacia prolongada sólo en el tercio restante de la población alérgica.

La duración del tratamiento de una inmunoterapia convencional es larga y laboriosa, comprendiendo normalmente un total de 30 a 100 inyecciones de alérgeno, requiriendo cada una 1 hora o más de estricta supervisión médica tras la administración de la inyección. Para la desensibilización frente a ciertos alérgenos que son conocidos porque causan efectos adversos graves, tales como el veneno de insecto, el pelo de gato o los ácaros del polvo, los pacientes deben permanecer en la consulta del médico durante una hora después de cada inyección para su observación. De este modo, los costes médicos y económicos para este tipo de tratamiento son muy altos.

Los regímenes de inyecciones para la alergia típicamente suponen 2 fases de tratamiento. La 1ª fase emplea cerca de 20 inyecciones para la alergia. Durante esta fase, se aumenta la cantidad de alérgeno inyectada en cada dosis,

empezando con cantidades insignificantes (tan pequeñas como 0,01 μg). Las inyecciones de extractos del alérgeno diluidos se administran en un programa regular, normalmente dos veces a la semana o semanalmente al principio, en dosis crecientes hasta que se alcanza una dosis de mantenimiento de aproximadamente 100 μg. Esta dosis de mantenimiento, alcanzada después de aproximadamente 20 semanas, se inyecta a continuación cada 2 a 4 semanas durante un periodo de 3 o más años.

Normalmente, alcanzar una dosis de mantenimiento supone varios meses y puede llevar hasta 3 años. Los pacientes pueden experimentar algún alivio antes de 6 meses; sin embargo, las inyecciones se interrumpen generalmente si no se ha observado ningún beneficio a los 18 meses. Tras detener la inmunoterapia, aproximadamente un tercio de las personas que sufren alergia deja de tener síntomas, otro tercio presenta reducción de síntomas y el tercio restante recae por completo.

Además, durante la fase de desensibilización, cuanto más alérgeno se administra, las inyecciones normalmente causan efectos adversos moderados y algunas veces graves que oscilan de dolor e hinchazón local (pápula) o exantema (erupción) en el lugar de inyección a efectos alérgicos sistémicos, tales como exantema cutáneo generalizado o habones (urticaria), asma o incluso choque alérgico (anafilaxis). Otros efectos adversos comunes de la inmunoterapia incluyen picor generalizado (prurito), enrojecimiento de los ojos y caída de la presión sanguínea. Los efectos adversos normalmente aparecen antes de 20 minutos, aunque algunos pueden desarrollarse hasta 2 horas después de que se administre la inyección para la alergia. La anafilaxis referida a una reacción alérgica se caracteriza por una caída pronunciada en la presión sanguínea, habones o ronchas y dificultades para respirar, que tienen lugar de forma inmediata, progresando rápidamente y siendo potencialmente mortal. La anafilaxis es la reacción más grave que puede darse a partir de una inmunoterapia convencional.

El desarrollo de una respuesta inmune específica requiere que las células del sistema inmune se encuentren con un antígeno, y que los linfocitos T y B interaccionen entre si y con otras células presentadoras de antígenos (APC) para eliminar los patógenos o toxinas extracelulares. Cuando una persona alérgica entra en contacto por primera vez con un alérgeno, el sistema inmune genera grandes cantidades de un tipo de anticuerpo denominado inmunoglobulina E o IgE. Cada anticuerpo IgE se une con elevada afinidad a una sustancia alergénica en particular. En el caso de alergia al polen, el anticuerpo es específico para cada tipo de polen. Por ejemplo, se produce un tipo de anticuerpo para reaccionar frente al polen de la hierba de San Juan y otro frente al polen de la ambrosía. El veneno de la abeja, que contiene la proteína PLA_2, produce como respuesta anticuerpos anti-PLA_2. Durante la fase inicial de la respuesta inmune, se generan anticuerpo IgG1 específicos anti-PLA_2 de baja afinidad. Después de repetidas picaduras, los pacientes con una inmunidad normal desarrollan anticuerpos IgG4 específicos anti-PLA_2 de alta afinidad, pero los pacientes alérgicos al veneno de abeja desarrollan anticuerpos IgE específicos anti-PLA_2. Los mastocitos de los tejidos inmunoestimulados y los basófilos de la sangre se unirán al anticuerpo IgE y liberaran potentes mediadores inflamatorios (citoquinas). Estas citoquinas actúan en los tejidos de diversas partes del organismo, tales como el sistema respiratorio, causando los síntomas de la alergia.

La inmunoterapia eficaz se acompaña de un descenso de la IgE específica de PLA_2 y un aumento de la IgG específica de PLA_2. Los mecanismos precisos mediante los cuales la inmunoterapia con alérgenos logra una mejora clínica en los síntomas de los pacientes alérgicos siguen sin estar completamente claros, pero se piensa que los anticuerpos IgG pueden proteger frente a la reacción alérgica. La inmunoterapia se asocia con una reducción de la secreción de citoquinas IL-4 e IL-5 inducidas por el alérgeno y un aumento simultáneo de la secreción de IFN-γ a partir de células T específicas del alérgeno.

La solicitud PCT documento WO 01/82963 entra dentro de los términos del artículo 54(3) y se refiere a procedimientos y composiciones para inducir a una célula presentadora de antígenos a presentar un epítopo específico de célula diana, promoviendo de ese modo una respuesta de células T citotóxicas eficaz frente a la célula diana.

Resumen de la invención

La presente descripción se refiere a un procedimiento eficaz de suministro de alérgenos.

La descripción también se refiere a un procedimiento para suministrar alérgenos que emplea de forma eficaz una dosis baja de alérgenos.

La descripción también se refiere a un régimen de tratamiento para las alergias que es eficaz para modular una afección alérgica tras sólo unas pocas inyecciones.

La descripción también se refiere a un modo de tratamiento con alérgenos que se caracteriza por reducir los efectos secundarios adversos.

También se describe un procedimiento para modular una respuesta alérgica de un individuo que comprende suministrar mediante inyección directa un alérgeno a un ganglio linfático de dicho individuo en el que se modula la respuesta alérgica. En los individuos que carecen de ganglios linfáticos o que poseen ganglios linfáticos defectuosos, el alérgeno puede administrarse al tejido linfático o a una célula inmune. La presente invención proporciona el uso de un alérgeno para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la alergia mediante la inyección directa del medicamento en un ganglio linfático del individuo. En un aspecto específico de la invención, el alérgeno se combi-

na con un adyuvante, se precipita o se une con una sustancia o formulación de suministro. Aún otros aspectos de la invención se describen en la descripción de las realizaciones preferidas de la invención.

Un procedimiento descrito en este documento contempla el uso de administración intraganglionar de medicamentos fabricados para reequilibrar el sistema inmune más eficazmente que lo que se puede conseguir utilizando inmunoterapia convencional. El medicamento según la presente descripción proporciona modulación eficiente y eficaz de una amplia variedad de respuestas alérgicas y representa una mejora principal sobre la aproximación actual. Por ejemplo, puede lograrse una modulación o eliminación de una afección alérgica con tan sólo de 1 a 3 inyecciones.

El suministro dirigido también permite el uso de cantidades más pequeñas de alérgeno que las que se usan en inyecciones para la alergia convencionales, reduciendo mucho el potencial de efectos adversos, tales como urticaria, disnea, síncope, hipotensión, acontecimientos miocárdicos e incluso la muerte.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama de un ganglio linfático, que muestra las zonas medular (11) y cortical (12).

La Fig. 2 muestra una imagen de ultrasonidos de una aguja (21) insertada en un ganglio linfático inguinal (22).

La Fig. 3 muestra una imagen de ultrasonidos de un ganglio linfático inguinal antes de la administración de una vacuna intraganglionar.

La Fig. 4 muestra una imagen de ultrasonidos de un ganglio linfático inguinal 6 días después de la administración de una vacuna intraganglionar.

La Fig. 5 muestra los resultados del ELISA que demuestran los efectos sobre los valores de IgG2a a lo largo del tiempo tras la inyección de fosfolipasa A_2 (PLA_2) por diferentes vías de suministro en ratones CBA/J. Fig. 5A, 0,1 μg de PLA_2 inyectados por vía intraperitoneal; Fig. 5B, 10 μg de PLA_2 inyectados por vía intraperitoneal; Fig. 5C, 0,1 μg de PLA_2 inyectados dentro de un ganglio linfático; Fig. 5D, 10 μg de PLA_2 inyectados dentro de un ganglio linfático; Fig. 5E, 0,1 μg de PLA_2 inyectado por vía subcutánea; Fig. 5F, 10 μg de PLA_2 inyectados por vía subcutánea.

La Fig. 6 muestra los resultados del ELISA que demuestra los efectos en los valores de IgE a lo largo del tiempo tras la inyección de fosfolipasa A_2 (PLA_2) por diferentes vías de suministro en ratones CBA/J.

Fig. 6A 0,1 μg de PLA_2 inyectados por vía intraperitoneal; Fig. 6B, 10 μg de PLA_2 inyectados por vía intraperitoneal; Fig. 6C, 0,1 μg de PLA_2 inyectados dentro de un ganglio linfático; Fig. 6D, 10 μg de PLA_2 inyectados dentro de un ganglio linfático; Fig. 6E, 0,1 μg de PLA_2 inyectados por vía subcutánea; Fig. 6F, 10 μg de PLA_2 inyectados por vía subcutánea.

La Fig. 7 muestra las cantidades relativas de IgG2a medidas en ratones inyectados por vía intraganglional y subcutánea con PLA_2. Fig. 7A, niveles de IgG2a detectados por ELISA a las 2, 4, 6, y 8 semanas tras la administración intraganglionar de PLA_2; Fig. 7B, niveles de IgG2 a las 2, 4, 6 y 8 semanas tras la inyección subcutánea de PLA_2.

La Fig. 8 muestra las cantidades relativas de IgE medidas en ratones inyectados por vía intraganglional y subcutánea con PLA_2. Fig 8A muestra que no hay actividad IgE durante las 8 semanas que siguieron al suministro intraganglionar de PLA_2. La Fig. 8B muestra los niveles de actividad IgE a las 6 semanas y a las 8 semanas tras la inyección subcutánea de PLA_2.

Descripción detallada

La presente invención es útil en cualquier animal que tenga un sistema inmune que incluya sistema linfático. Este campo de uso generalmente incluye a mamíferos y humanos. Mientras que probablemente el uso principal de la invención sea el tratamiento de humanos, también será adecuado para el tratamiento de animales, incluyendo mascotas domésticas tales como perros y gatos.

La presente invención proporciona el uso de un alérgeno para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la alergia mediante la inyección directa del medicamento en un ganglio linfático de un individuo. La presente invención también proporciona el uso de un ácido nucleico que codifica un alérgeno para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la alergia mediante la inyección directa del medicamento en un ganglio linfático de un individuo.

Se describe un procedimiento que implica el suministro de un medicamento a partir de un alérgeno mediante inyección directamente en un ganglio linfático para modular una respuesta alérgica en un individuo (por ejemplo, para producir una respuesta IgG) más eficazmente que la que es posible obtener mediante inyección subcutánea. La modulación de una respuesta alérgica incluye, pero sin limitaciones, una disminución o eliminación de respuestas tales como alteraciones en los niveles de IgG específica, alteraciones en las proporciones de IgG, alteraciones en los niveles específicos de IgE, disminución de la sensibilidad al alérgeno o a un agente alergénico con reacción cruzada, alteraciones en los basófilos activados (tal como la reducción de la cantidad de IgE superficial), alteraciones en los perfiles de

citoquinas (tal como un aumento en las citoquinas de tipo 1, por ejemplo, IL-2 e INF-γ, frente a las citoquinas de tipo 2, por ejemplo, IL-4, IL-5), alteraciones en los resultados de la prueba radioalergoabsorbente (RAST) o en las pruebas cutáneas, así como disminución o eliminación de los síntomas de una respuesta alérgica, tal como urticaria, picor, malestar, ansiedad, angioedema, opresión en el pecho, nauseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, mareos, disnea, sibilancias, estridor, disfagia, disartria, ronquera, debilidad, confusión, caída de la presión sanguínea, colapso, pérdida de consciencia, incontinencia, cianosis, producción de moco, tos, retortijones de estómago, rinitis, alergia al polen, asma, inflamación y similares.

La administración intraganglionar de alérgenos tiene varias ventajas. Debido a que dosis menores de alérgeno pueden inducir una respuesta IgG más potente cuando se inyectan directamente en un ganglio linfático, hay menores efectos adversos que los observados utilizando el régimen de inyección para la alergia convencional. Además, el suministro del alérgeno al ganglio linfático mediante inyección no es más doloroso para el paciente que las inyecciones subcutáneas normales. Una ventaja adicional de este procedimiento es que normalmente sólo son necesarios dos o tres tratamientos para desensibilizar al individuo frente a un alérgeno. Esto reduce el riesgo de efectos secundarios o de reacción a la administración y da lugar a una reducción significativa de los costes en comparación con tratamientos alérgicos tradicionales.

Un "alérgeno" según la invención puede ser cualquier sustancia o porción de la misma que produce una respuesta alérgica. Por ejemplo, alérgenos comunes incluyen veneno de abeja, veneno de avispa, veneno de hormiga roja, pólenes, incluyendo pólenes de césped, árboles y pólenes de hierbas, penicilina y otros fármacos, anestésicos, suero, animales, escamas de animales, cucarachas, ácaros del polvo, alérgenos de alimentos, tales como los encontrados en cacahuetes, frutos secos, leche, pescado, marisco, huevos, soja, trigo, miel, frutas, virus, bacterias, mohos, protozoos o látex. Los alérgenos también pueden ser cualquier componente del alérgeno que produzca una respuesta alérgica, tal como PLA_2 en el veneno de abeja o urushiol en el veneno de la hiedra. Asimismo, un alérgeno puede ser una mezcla de sustancias o un extracto natural o purificado de una composición generalmente alergénica. Estos alérgenos pueden recuperarse de una fuente natural o pueden ser sustancias sintéticas o no naturales, tal como una proteína recombinante, un péptido sintético o un compuesto químico mimético (incluyendo un péptido) que produce una respuesta alérgica similar a la de un alérgeno natural.

El medicamento según la presente descripción comprende uno o más alérgenos, o una o más construcciones de ácido nucleico que codifican los alérgenos. La construcción de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ARN o ADN o puede simplemente ser una construcción de ácido nucleico desnudo, tal como un plásmido o un virus, que codifica el alérgeno. El alérgeno o construcción de ácido nucleico pueden, si se desea, administrarse a un tipo de célula específico dentro de un ganglio linfático, tal como una célula dendrítica. Un tipo celular específico puede ser, si se desea, transfectado con la construcción de ácido nucleico de modo que exprese el alérgeno. Opcionalmente, la construcción de ácido nucleico puede ser dirigida a través de un vector al tipo celular deseado.

Las realizaciones de la invención pueden adaptarse de modo que traten cualquier enfermedad que incluya una respuesta de tipo alérgico. Por ejemplo, varias enfermedades producidas por virus, bacterias, protozoos y otras enfermedades recién descubiertas y/o poco conocidas que se dan en la población humana. Hasta el punto en que estas enfermedades tengan un componente patogénico que implique una respuesta alérgica o una respuesta IgE, las realizaciones de la invención pueden usarse para reducir la virulencia de estas enfermedades y/o para proteger a las personas frente a estas enfermedades. El nuevo procedimiento de administración contemplado en esta invención también puede usarse para mejorar los aspectos del asma y del choque anafiláctico asociado con la hipersensibilidad a alérgenos.

El alérgeno puede encapsularse en un material polimérico para lograr una liberación mantenida o pulsátil. La forma de la encapsulación puede ser, por ejemplo, nano o microesferas, geles inyectables o implantes. Materiales poliméricos adecuados incluyen, sin limitación, poliésteres PLGA biodegradables (polilactida-co-glicólida), polianhídridos, polisacáridos (por ejemplo, quitosano, almidón, alginato), derivados de celulosa (por ejemplo, etil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), proteínas (por ejemplo, colágeno, albúmina) o poliacrilatos.

El alérgeno, preferiblemente se administra en un vehículo fisiológicamente aceptable para la inyección. En general, en esta invención puede usarse cualquier vehículo fisiológicamente aceptable conocido para su uso en vacunas o inyecciones para la alergia. La elección de estos vehículos incluye, sin limitaciones, agua, soluciones salinas convencionales, soluciones de dextrosa y agua con albúmina y están fácilmente dentro de la experiencia en la materia.

En una realización preferida, el alérgeno se combina con un adyuvante. El adyuvante puede ser, pero sin limitaciones, uno o más de los siguientes: alumbre, BCG; hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato cálcico, emulsiones lipídicas, nano o microesferas lipídicas o poliméricas, micelas, liposomas, saponina, lípido A, dipéptido ormuramil, productos bacterianos, quemocinas, citoquinas y hormonas, quitosano, almidón, alginato, derivados de celulosa (por ejemplo, etil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), ácidos nucleicos o una construcción de ácido nucleico. Puede añadirse uno o más de estos componentes para potenciar la respuesta inmune, aumentar la adsorción del alérgeno, proporcionar un aumento del confort del paciente y/o disminuir la liberación del alérgeno para la exposición prolongada. Alternativamente, el alérgeno puede administrarse sin un adyuvante o en forma acuosa.

El alérgeno puede suministrarse en una dosis de aproximadamente 0,1 μg a 50 μg y más preferiblemente en una dosis de aproximadamente 0,1 μg a aproximadamente 10 μg, aunque la dosis óptima puede variar dependiendo del alérgeno que se va a inyectar, el peso del paciente, el sistema inmune del paciente y similares. El tratamiento eficaz

en muchos casos puede lograrse con un suministro. En algunos casos, el tratamiento incluye de 1 a 15 inyecciones. Por ejemplo, la escalada convencional tras una dosis ensayada de 0,1 μg implica la administración de 1 μg seguido de 5 μg y 10 μg. La escalada de la dosis depende de la tolerancia del paciente a la dosis previa. Pueden administrarse periódicamente inyecciones múltiples, por ejemplo durante el curso de varios días, una o dos veces al mes y varias veces al año.

La dosis empleada durante la fase inicial (desensibilización) puede ser de 0,1 μg a 10 μg administrados de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 3 inyecciones de 1 μg, 5 μg y 10 μg durante el curso de varios días a 3 meses. Preferiblemente, el alérgeno se administra de 2 a 3 veces, separadas de 1 a 2 semanas. Durante el tratamiento de desensibilización, se administran directamente de 50 μl a 200 μl de una composición que contiene el alérgeno directamente dentro del ganglio linfático empezando con dosis muy pequeñas de alérgeno, de 0,1 μg hasta 10 μg. Esta dosis es la décima parte de la dosis normal para la inmunoterapia subcutánea y, por tanto, se minimiza la posibilidad de efectos secundarios.

La dosis empleada durante la fase de mantenimiento puede ser de 0,1 μg a 50 μg, preferiblemente de 0,1 μg a 20 μg, suministrados periódicamente durante el transcurso de varios meses a varios años. Durante el tratamiento de mantenimiento, se inyectan en el ganglio linfático del paciente de 0,1 μg a 50 μg de alérgeno típicamente en inyecciones de 50 μl a 200 μl cada uno. Un experto en la materia reconocerá que incluso es posible emplear cantidades de vehículo más pequeñas.

Opcionalmente, puede visualizarse el ganglio linfático durante el procedimiento de inyección. Pueden usarse medios de ultrasonidos, radiológicos u otros medios de visualización tal como, tomografía axial computerizada (análisis por TAC), para visualizar el nódulo linfático y controlar la localización de la aguja y los cambios en el ganglio linfático, tan como la hinchazón. Se prefiere la inyección en los ganglios linfáticos axilares e inguinales debido a una fácil localización e inyección guiada por ultrasonidos. La Fig. 1 es un diagrama de un ganglio linfático, con flechas que muestran las zonas medular (11) y cortical (12).

Durante la administración del alérgeno, normalmente se controlan de cerca los signos vitales del paciente y se controla la reacción del ganglio linfático, por ejemplo, mediante ultrasonidos u otros procedimientos de visualización. La Fig. 2 es una imagen de ultrasonidos de una aguja (21) insertada en un ganglio linfático inguinal (22). La Fig. 3 muestra una imagen de ultrasonidos de un ganglio linfático antes de la terapia intraganglionar. La Fig. 4. muestra una imagen de ultrasonidos del mismo ganglio linfático tras la terapia intraganglionar.

La técnica usada para la inyección está dentro de la experiencia en la materia. Un procedimiento es usar una jeringa de doble cámara en la que el alérgeno está incluido en una cámara y el vehículo líquido en la otra, para mezclar antes de la inyección.

Preferiblemente, el alérgeno se suministra directamente al ganglio linfático tanto durante el tratamiento de desensibilización como durante el tratamiento de mantenimiento. Alternativamente, el alérgeno puede administrase directamente al ganglio linfático durante la fase de desensibilización y por vía subcutánea durante la fase de mantenimiento. Aunque menos preferidos, se pueden conferir algunos beneficios si se emplea la terapia intraganglionar durante la desensibilización y la terapia subcutánea se emplea durante el mantenimiento.

Para determinar la eficacia de la administración del alérgeno, pueden analizarse en el paciente las reacciones en condiciones iniciales antes de iniciar la administración, usando ensayos tales como la medida de los niveles de IgG e IgE, estimulación de células T, activación de basófilos y/o exposiciones controladas a alérgenos, tales como las pruebas cutáneas y estimulación por picadura de abeja. Para determinar si un paciente ha sido desensibilizado, puede compararse una o más de estas medidas con las medidas tomadas tras la administración. Ejemplos de ensayos adecuados se proporcionan en el Ejemplo 14. Se incluyen bien dentro de la técnica identificar y emplear ensayos alternativos.

La eficacia de administración intraganglionar se ha demostrado en modelos de ratones. En modelos de ratones, la terapia intraganglionar induce elevados niveles de IgG2a y una respuesta IgE no detectable, mientras que la inmunización convencional induce niveles de IgE dependiente de T_H2 y sólo bajos niveles de IgG2a dependiente de T_H1. A menos que se establezca lo contrario, el suministro de las formulaciones intraganglionales en cantidades insignificantes y las concentraciones, de otro modo no inmunogénicas, inducen fuertes respuestas T_H1, que llevan a respuesta IgG2a más elevadas y más prolongadas que la inmunoterapia convencional.

El hecho de que la administración intraganglionar de PLA_2 induzca respuestas IgG2a elevadas se demostró cuando se suministraron cantidades diferentes de PLA_2 en ratones mediante la inyección directa dentro de un ganglio linfático inguinal y se comparó con inyecciones convencionales subcutáneas de PLA_2 (Fig. 5). Se recogieron muestras de sangre para analizar las respuestas de anticuerpos IgG2a a las 2, 4, 6, 8 y 10 semanas. Al contrario de los resultados convencionales de la inducción de IgG2a, la terapia de pequeñas dosis intraganglionares con PLA_2 es suficiente para inducir una potente respuesta IgG2a, pero sólo una débil respuesta IgE (Fig. 6). Con estas inyecciones de bajas dosis, se indujeron valores de IgE no significativos para ninguna de las administraciones.

La terapia intraganglionar, usando aproximadamente 1/1.000 de los antígenos requeridos en la formulación convencional, inducía valores de IgG2a en los cinco ratones inyectados con un valor medio de 1:1.000, mientras que la terapia convencional con la misma dosis inducía niveles no detectables de valores de IgG2a. En dos de los tres ratones

inyectados por vía intraganglional con sólo 0,1 μg de PLA_2 se indujo una potente respuesta IgG2a. Por el contrario, el tratamiento convencional con la misma dosis no inducía respuesta IgG2a significativa. Para inducir una respuesta IgG2a incluso mucho menor frente a PLA_2 usando la terapia convencional, deben usarse en la inmunización 10 μg de alérgeno.

La Fig. 7 muestra la respuesta IgG2a a las 2, 4, 6 y 8 semanas tras la terapia intraganglional y subcutánea. La inyección de PLA_2 usando una administración intraganglionar activa la respuesta IgG2a a una dosis (0,1 μg) que no es eficaz con el suministro subcutáneo. En la Fig. 8, se muestran los niveles de actividad IgE tras 2, 4, 6, y 8 semanas de terapia. La inyección de PLA_2 usando suministro intraganglionar no activa la producción de IgE.

Estos resultados confirman la superioridad, en forma y grado, de la respuesta a partir de la terapia intraganglionar. Las valoraciones muestran que la inyección intraganglionar se corresponde con un aumento de la dosis subcutánea convencional de aproximadamente 1.000 veces, sin aumentar los efectos secundarios. Los ejemplos siguientes muestran diversas preparaciones que contienen alérgenos, diferentes vías de administración usando como ejemplo el alérgeno PLA_2, el alérgeno principal del veneno de abeja, y varios medios para medir la eficacia de esta estrategia. Se muestra que la administración directa en el ganglio linfático inguinal induce valores de IgG2a específica del alérgeno más de 100 veces más eficazmente que la inyección intraperitoneal o subcutánea. Entre las subclases de IgG, se sabe que la IgG2a es la subclase que depende más estrictamente de T_H1, indicando de este modo una potente respuesta T_H1 frente al alérgeno. Esta respuesta T_H1 es deseable ya que se contrapone a la respuesta T_H2, que es la responsable de la producción de IgE en individuos alérgicos. Los ejemplos se incluyen sólo con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación del alérgeno de veneno de abeja

Se recogieron abejas y se congelaron inmediatamente para su almacenamiento. A continuación, los insectos se descongelaron, se diseccionaron las glándulas del veneno y se colocaron en una solución de sacarosa al 5% (pH 4,5-5,5). Las glándulas se lavaron varias veces, se homogeneizaron a continuación y los restos insolubles se retiraron por filtración usando una membrana de 0,22 μm.

La concentración de proteínas de la solución de veneno filtrada se midió usando un ensayo con colorante Coomassie y se diluyó hasta la concentración necesaria usando una solución de sacarosa al 5%. A esta se le añadió Tween 80 al 0,01% y Pluronic F68 al 0,01%. La solución se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0,22 μm, se dosificó en viales y se liofilizó. Tras el ciclo de liofilización, los viales se sellaron al vacío. Antes de la administración, la vacuna se reconstituyó usando agua para inyección USP.

Ejemplo 2

Preparación de alérgenos del veneno de véspula, avispón o avispa

Se recogieron véspulas, avispones o avispas y se congelaron inmediatamente para su almacenamiento. A continuación, los insectos se descongelaron, se diseccionaron las glándulas del veneno y se colocaron en tampón beta alanina/ácido acético 0,025 M (pH 4,8) en cloruro sódico al 0,54%. A continuación, los sacos se homogenizaron y los restos insolubles se separaron por centrifugación. El sobrenadante que contiene el veneno se filtra usando una membrana de 0,22 μm, se mezcla con agentes de carga, tales como manitol, se dosifica en viales y se liofiliza. A continuación, los viales se sellan al vacío. Para la administración, la vacuna se reconstituye usando una solución farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina normal o dextrosa al 5%. La preparación de estos venenos de véspidos también puede ser la misma que para la preparación del veneno de abeja del Ejemplo 1 anterior.

Ejemplo 3

Preparación de la vacuna microencapsulada de veneno de abeja

La proteína de veneno de abeja (1 mg) se disuelve en 100 μl de agua o solución acuosa. El PLGA, un polímero biodegradable (100 mg) se disuelve en 1 ml de cloruro de metileno. Se añade la solución de veneno de abeja a la solución de PLGA y se homogeneiza, dando lugar a una emulsión de agua en aceite. La emulsión de agua en aceite se vierte sobre una solución acuosa de PVA al 5% (10 ml) y se agita para producir una emulsión de agua en aceite en agua. Esta emulsión se añade a 100 ml de una solución de PVA al 1% para extraer el cloruro de metileno. Las microesferas se recogen por centrifugación, se lavan 3 veces con agua destilada y se liofilizan.

Ejemplo 4

Purificación de una vacuna de un alérgeno peptídico

PLA_2 es un polipéptido (PM 19.000) que es el principal alérgeno del veneno de abeja. Puede purificarse a través de HPLC en fase inversa. El veneno de abeja natural se disuelve en agua a una concentración del 10% y se filtra a través de una membrana de 0,22 μm. La solución de veneno de abeja filtrada (500 μl) se inyecta en una columna Brownlee Aquapore RP300CB equilibrada con TFA al 0,1% desarrollada a 1 ml/min. La columna se eluye con un gradiente de acetonitrilo del 0 al 60% durante 45 minutos a 1 ml/min. Se recogen fracciones de 1 ml y se analizan midiendo la absorbancia a luz UV a 280 nm. La identidad y pureza de las fracciones recogidas se analiza usando PAGE-SDS. Las fracciones de PLA_2 pura se mezclan y liofilizan. Las fracciones de PLA_2 que contienen impurezas se purifican otra vez usando HPLC en fase inversa.

Ejemplo 5

Preparación de una vacuna de alérgeno a partir de un extracto purificado

PLA_2, el principal componente alergénico del veneno de abeja, se purifica usando cromatografía y puede obtenerse a partir de fuentes comerciales, tales como SIGMA. PLA_2 se disuelve en una solución inyectable farmacéuticamente aceptable, tal como agua, solución salina normal, agua con dextrosa al 5% o solución de Ringer. La solución de PLA_2 se usa en el suministro intralinfática.

Ejemplo 6

Preparación de una vacuna de alérgeno a partir de un extracto natural

El veneno de abeja puede recogerse a partir de aguijones de abeja mediante electroestimulación. El veneno de la abeja puede secarse al aire para su almacenamiento. Para preparar la vacuna, el veneno de abeja se disuelve en tampón beta alanina/ácido acético 0,025 M (pH 4,8) en cloruro sódico al 0,54%. El material insoluble se retira usando un filtro estéril de 0,22 μm. El pH de la solución se ajusta a un valor neutro usando tampón fosfato y la solución se usa directamente como vacuna frente al veneno de abeja. Alternativamente, la solución de veneno de abeja puede liofilizarse para estabilizar su almacenamiento.

Ejemplo 7

Preparación de una vacuna de alérgeno a partir de células transfectadas

Células 293 HEK humanas se transfectan con pIND/V5-His (Invitrogen) que contiene un clon del ADNc de longitud completa de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) de abeja. PLA_2 se manipula por ingeniería genética para que contenga una etiqueta de 6-histidina en su extremo N-terminal. Se transfectan frascos T-172 que contienen aproximadamente $5x10^6$ células con 15 μg de plásmido usando el reactivo LipofectACE™ (GIBCO BRL). Cuarenta y ocho horas después de la inducción, se recogen las células, se disuelven en tampón de lisis NP40 y se pasan a través de una columna Ni. La PLA_2 recombinante se eluye con imidazol 200 mM y la proteína se analiza mediante PAGE-SDS, tinción para proteínas e inmunoelectroforesis.

Ejemplo 8

Preparación de una vacuna de alérgeno a partir de una mezcla de alérgenos múltiples

El veneno de diversas especies de véspulas y avispas se disuelve en tampón beta alanina/ácido acético en las proporciones apropiadas. Esta solución se liofiliza en presencia de agentes de carga, tales como manitol y sacarosa, y se reconstituye antes de su administración.

Ejemplo 9

Preparación de una vacuna de alérgeno de ácido nucleico

La PLA_2 de abeja se amplifica a partir del ARNm preparado a partir de las glándulas de veneno recién obtenidas usando RT-PCR y cebadores específicos. A continuación, el producto amplificado se subclona en pcDNA1.1/Amp (Invitrogen). Los plásmidos que contienen la inserción se seleccionan mediante análisis de restricción y, a continuación, se secuencian en su integridad. La expresión de PLA_2 se controla como se describe en el Ejemplo 6. El plásmido se amplifica en células de *E. coli* DH5a y se purifica usando el sistema de purificación de plásmidos Qiagen.

Ejemplo 10

Preparación de una vacuna adyuvante

La vacuna adyuvante puede prepararse adsorbiendo la vacuna a un adyuvante o encapsulando la vacuna en un material vehículo, tal como un polímero o un lípido. La adsorción se realiza simplemente mezclado la vacuna con el adyuvante en condiciones apropiadas. Por ejemplo, se añade la solución de la vacuna de veneno de abeja a una suspensión de alumbre a pH > 5. De forma similar, el veneno de abeja puede añadirse a una emulsión de aceite en agua, a una solución de tensioactivo pluronic o a una suspensión de microesferas PLGA para estimular la respuesta inmunológica. La encapsulación de la vacuna se realiza usando diversos procedimientos, tales como secado por pulverización, evaporación del disolvente, coacervación, precipitación o mezclado. El procedimiento de encapsulación del veneno de abeja se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplo 11

Uso de ultrasonidos para localizar el ganglio linfático

Un ganglio linfático se localiza con la ayuda de ultrasonidos. Los ganglios linfáticos inguinales tienen un flujo linfático relativamente bajo y se localizan alejados de los principales vasos sanguíneos. Se obtiene una visión general de la región inguinal para seleccionar un ganglio linfático para administrar la vacuna. Se selecciona el ganglio linfático con el mayor eje longitudinal (1-1,5 cm) para facilitar la colocación de la aguja. Los ultrasonidos se usan para conducir la aguja y controlar el ganglio linfático, asegurando que el alérgeno se suministra en el ganglio linfático.

Ejemplo 12

Administración de una vacuna de alérgeno a un ganglio linfático

Se localiza un ganglio linfático con la ayuda de ultrasonidos. Se afeita el sitio de inyección del paciente. El técnico de ultrasonidos desinfecta el sitio usando guantes quirúrgicos. La sonda de ultrasonidos se mantiene cubierta con gel de contacto esterilizado. La aguja se introduce en la corteza del ganglio linfático y la posición de la punta se evalúa moviéndola ligeramente y controlando su posición usando el aparato de ultrasonidos. Cuando la posición parece correcta, la vacuna se suministra directamente en el ganglio linfático, empezando con dosis muy pequeñas. La dosis se incrementa de forma similar al protocolo convencional usado para la desensibilización subcutánea. Todos los parámetros vitales del paciente se controlan de cerca y la reacción del ganglio linfático se controla mediante ultrasonidos.

El posterior control por ultrasonido del ganglio linfático muestra un aumento del tamaño del área paracortical. Debido que esta es la localización de los linfocitos T en el ganglio linfático, este aumento en su diámetro probablemente indica una actividad específica de células T, a diferencia de la hinchazón del área medular, lo que podría sugerir una inflamación no específica o edema. Este aumento disminuye al final del tratamiento, indicando aparentemente que el ganglio linfático mantiene no sólo su morfología normal sino también su función normal.

Ejemplo 13

Programa de administración de alérgenos

Se administran tres inyecciones de 100 ml que contienen de 0,1 μg a 10 μg de alérgeno con 1 ó 2 semanas de diferencia, con posibles inyecciones posteriores de mantenimiento o reinmunizaciones de 0,1 μg a 50 μg de alérgeno en inyecciones de 100 ml, administradas periódicamente durante un periodo de varias semanas a varios años.

Ejemplo 14

Ensayo de la eficacia de una vacuna de alérgenos

Para demostrar que los resultados de la terapia sobre los ganglios linfáticos da lugar a la modulación, disminución o eliminación de reacciones alérgicas o disminuye la sensibilidad a un alérgeno, se recogieron criterios de valoración correlativos que incluían la medición de niveles de IgG e IgE, los cambios en el equilibrio T_H1/T_H2 mediante la media de citoquinas o quemocinas, así como los cambios en la activación de basófilos. Alternativamente, pueden usarse ensayos que utilizan ELISPOT o RAST y pruebas de exposición, tales como pruebas cutáneas o al aguijón de abejas para determinar un cambio en la reacción.

Según los datos de un estudio piloto en marcha, no había un aumento sustancial en los niveles de IgE específica del alérgeno en pacientes vacunados con vacunas frente al veneno de la picadura de abeja. Los pacientes en este estudio recibieron 3 tratamientos, con 2 semanas de separación. En la primera visita, a los pacientes se les inyectaban 0,1 μg, 1 μg, 5 μg y 5 μg. En los tratamientos 2 y 3, los pacientes recibieron una inyección de 10 μg. Además de los niveles de IgE, se midieron la IgG e IgG4 específica del veneno de abeja antes de la inyección, 2 semanas después y 4 semanas después. No había aumento significativo en la IgG total específica del veneno de abeja. Sin embargo, los niveles de IgG4 de los pacientes aumentaban tras la vacunación del 50-160% sobre los valores iniciales, lo que es similar al

aumento visto en la inmunoterapia rápida y ultrarrápida. Este aumento en la IgG4 daba lugar a un cambio en las proporciones de IgG del individuo. Dentro de esta realización, no se da la desgranulación sistémica de los mastocitos, lo que podría ser evidente debido a un aumento de la triptasa sérica.

A. *Inducción de una respuesta IgG*

Se inyectaron dos dosis del alérgeno PLA_2 de veneno de abeja en un ratón y se cuantificó el valor de IgG2a a lo largo del tiempo. La PLA_2 se inyectó con el adyuvante alumbre. Se eligieron tres sitios diferentes de suministro: en un ganglio linfático, subcutáneo e intraperitoneal.

La inyección con 0,1 μg de PLA_2 en el ganglio linfático inguinal inducía valores de IgG2a en los 5 ratones, con un valor medio de aproximadamente 1:1.000 (Fig. 5C). Esta respuesta no aumentaba con el aumento de la dosis (Fig. 5D). La inyección de la misma dosis por vía subcutánea no inducía valores de IgG2a medibles (Fig.. 5E). La inyección de 0,1 μg por vía intraperitoneal inducía valores bajos de IgG2a (aproximadamente 1:16) sólo en 2 de los 5 ratones (Fig. 5A).

Para inducir IgG2a específica frente a PLA_2 a través de la vía intraperitoneal y subcutánea, se requerían 10 μg del alérgeno (Fig. 5B+F). Sin embargo, los valores inducidos eran sólo de aproximadamente 1:50 (Fig. 5B+F) y, por tanto, estaban sólo a un nivel del 5% de los valores inducidos por la dosis más baja de la PLA_2 inyectada por vía intraganglional (Fig. 5C).

Por tanto, la administración intraganglionar inducía respuestas de anticuerpos IgG2a específicos del alérgeno que eran 20 veces superiores usando sólo el 1% de la dosis de alérgeno. Debido a que los efectos secundarios son directamente proporcionales a la dosis de alérgeno, la vacunación intraganglionar no sólo desensibiliza de forma más eficaz, sino que probablemente también produce menos efectos secundarios.

B. *Disminución de la respuesta IgE*

Se inyectaron dos dosis del alérgeno PLA_2 de veneno de abeja en un ratón y se cuantificó el valor de IgE a lo largo del tiempo. La PLA_2 se inyectó con el adyuvante alumbre. Se eligieron tres sitios diferentes de inyección: en un ganglio linfático, subcutáneo e intraperitoneal.

La inyección intraganglionar del alérgeno PLA_2, aunque inducía valores de IgG más eficazmente, no ocurría lo mismo con los valores de IgE. La inyección en un ganglio linfático con PLA_2 inducía menos IgE que la inyección intraperitoneal o subcutánea (Fig. 6).

C. *Estimulación <u>in vitro</u> de células T del paciente con antígeno de veneno de abeja*

Las respuestas de células T CD4 al alérgeno se ensayaron en pacientes tratados con veneno de abeja por vía intralinfática. Antes y después de la inyección, se obtiene una muestra de sangre completa y se aislan los PBMC mediante sedimentación en un gradiente de densidad de ficoll-hypaque. Se colocan un millón de PBMC en tubos de cultivo tisular de poliestireno de 12 x 75 mm que contienen 2 ml de medio completo. Los PBMC se cultivan con veneno de abeja, PHA o controles negativos durante 6 horas incluyendo durante las 5 horas finales 10 μg/ml de Brefeldina A (Sigma). Tras la incubación, las células se recogen mediante lavado una vez en PBS enfriado en hielo, se resuspenden en PBS con EDTA al 0,02%, se incuban a 37ºC durante 15 minutos y se lavan una vez más en PBS enfriado en hielo. Las células se recogen mediante resuspensión en PBS para un análisis inmediato o en paraformaldehido al 4% en PBS para un uso posterior. A continuación, las células se congelan para una tinción intracelular de citoquinas.

También pueden realizarse ensayos directamente sobre sangre completa, usando un sistema de activación de la sangre completa, tal como el Sistema FastImmune Cytokine de Becton Dickinson, para detectar la actividad de citoquina.

D. *Análisis de la producción de citoquinas por células T CD4 mediante citometría de flujo*

Células congeladas se descongelan rápidamente a 37ºC y, a continuación se lavan una vez en PBS enfriado en hielo/azida sódica al 1%/FCS al 1% antes de la resuspensión en solución de fijación/permeabilización. Las células se fijan y se permeabilizan durante 10 minutos. Las citoquinas intracelulares se detectan mediante incubación con anticuerpos anti-citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ y TNF-α) durante 30 minutos. Las células se bloquean con un anticuerpo frente al receptor FC durante 3 minutos y, a continuación, se lavan. Los marcadores de superficie se detectan mediante incubación con anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD9 durante 20 minutos en hielo. A continuación, las células se lavan de nuevo. Las células fijadas y permeabilizadas se incuban en hielo con AcM directamente marcado frente a CD4, IFN-γ, IL-2 y CD69 o CD4, IL-4, IL-5 y CD69 durante 30 minutos, a continuación se lavan y resuspenden en paraformaldehido al 1%. Además, el número de células teñidas con citoquinas T_H1 y citoquinas T_H2 se comparan directamente ente si, por ejemplo, IFN-γ e IL-4 con CD4 y CD69. La citometría de flujo se realiza con un FACScan usando 4 canales con FITC, PE, PerCP o AP como fluorocromos. Todos los análisis incluyen una valoración mínima de CD4+, CD69+ frente a citoquinas, o controles de coincidencia de isotipo, para buscar citoquinas de células T activas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ y TNF-α). Para cada análisis se obtienen 50.000 casos y se selecciona la

ventana para la expresión de CD4. Además, se usa una ventana que incluye sólo linfocitos pequeños viables mediante dispersión hacia delante y lateral. Se usa CellQuest para el análisis de los datos.

E. *Análisis de la respuesta de basófilos mediante citometría de flujo*

La sangre completa se estimula con el alérgeno, se marca mediante FACS y se selecciona una ventana para una población $CD123^+$, HLA-DR con dispersión lateral baja (basófilos). La detección se realiza mediante CD63 (un antígeno alfa granular). La expresión de CD63 aumenta en individuos alérgicos tras la estimulación con antígeno.

F. *ELISPOT para IFN-γ*

Placas HA de noventa y seis pocillos se recubren con 100 μl de anti-IFN-γ (5 μg/ml en tampón de recubrimiento de ELISA, pH 9,6, esterilizado por filtración) y se incuban durante toda la noche a 4ºC. Las placas se lavan 4 veces con PBS estéril, a continuación, se bloquean con 200 μl/pocillo de RPMI 1640/FCS al 10%/penicilina al 2% (v/v/v) estreptomicina, glutamina durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Se elimina la solución de bloqueo y las placas se lavan 3 veces con PBS estéril. Se añaden células a razón de 5 x 10^5/pocillo en 100 μl y se hacen 4 diluciones 1:2. Los pocillos control no contienen células.

Las placas se incuban a 37ºC/CO_2 al 5% durante 20 horas. Las placas se lavan 3 veces en PBS y después 3 veces en tampón de lavado. Se añade un anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón específico de IFN-γ (dilución 100:1 1/1.000 (v/v) en RPMI/FCS al 10%/PSG al 2%) y las placas se incuban durante toda la noche a 4ºC. Las placas se lavan 3 veces con PBS. Se añade un anticuerpo α-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) a una dilución de 1/20.000 (v/v) en 100 μl de PBS/Tween al 0,05% (v/v) que contiene BSA al 1% (p/v) (BDH). Las placas se incuban durante la noche a 4ºC.

Las placas se lavan 4 veces con PBS. Las manchas se desarrollan mediante la incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (comprimidos rápidos de BCIP/NBT de Sigma, Sigma) (1 comprimido en 10 ml de agua destilada) durante 30 minutos a 37ºC. Las placas se lavaron con agua y se secaron al aire durante 2 horas. Las manchas se contaron usando una lupa.

Cuantificación de células productoras de citoquinas mediante ELISPOT

Placas HA de noventa y seis pocillos se recubren con un anticuerpo anti-citoquina y se incuban a 4ºC durante toda la noche. Las placas se lavan 4 veces en PBS estéril y se bloquean para minimizar la unión no específica. Se elimina la solución de bloqueo y las placas se lavan 3 veces con PBS estéril. Se añaden células a razón de 5 x 10^5/pocillo en 100 μl y se hacen 4 diluciones 1:2. Los pocillos control no contienen células.

Las placas se incuban a 37ºC/CO_2 al 5% durante 20 horas. Las placas se lavan 3 veces en PBS, y después 3 veces en tampón de lavado. Se añade anticuerpo secundario anti-citoquina y las placas se incuban durante toda la noche a 4ºC. A continuación, las placas se lavan 3 veces en PBS. Se añade un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina que reconoce el anticuerpo secundario en 100 μl de PBS/Tween al 0,05% (v/v) que contiene BSA al 1% (p/v) y las placas se incuban durante toda la noche a 4ºC.

Las placas se lavan 4 veces con PBS. Las manchas se desarrollan mediante la incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (comprimidos rápidos de BCIP/NBT de Sigma, Sigma) (1 comprimido en 10 ml de agua destilada) durante 30 minutos a 37ºC. Las placas se lavan con agua y se secan al aire durante 2 horas, tras lo cual se cuentan las manchas.

G. *RAST*

La prueba radioalergoabsorbente es una prueba sanguínea usada para controlar la respuesta a la inmunoterapia. La sangre se recoge de una vena, dedo, talón o del lóbulo de la oreja, se transfiere a tubos estériles y se trata con un anticoagulante. A continuación, se miden en la sangre completa la cantidad de anticuerpos IgE mediante radioinmunoensayo, detección que podría indicar una respuesta alérgica. La ausencia de niveles de IgE indica ausencia de hipersensibilidad.

H. *Pruebas cutáneas*

Las pruebas cutáneas pueden realizarse mediante procedimientos de pinchazo o intradérmicos. La punción por pinchazo se realiza colocando una gota de alérgeno y una gota de la solución control a una distancia de 2 cm en el brazo. Se hace pasar una aguja hipodérmica desechable a través de la gota y dentro de la superficie de la piel. La punta de la aguja se eleva, elevando la epidermis sin causar sangrado, se retira a continuación y la solución se seca después de 1 minuto. Las pruebas intradérmicas se realizan mediante la inyección de aproximadamente 0,01 a 0,05 ml del alérgeno en las capas superficiales de la piel, evitando el lecho capilar subepidérmico. Esto podría producir una pequeña burbuja de aproximadamente 2 a 3 mm de diámetro. Una pápula de 3 mm acompañada de una erupción de 10 mm y el picor probablemente representa una reacción inmunológica positiva e indica la presencia de anticuerpos IgE.

I. *Estimulación con el aguijón de la abeja*

Una estimulación con el aguijón de la abeja se realiza aplicando una abeja viva en el antebrazo del paciente permitiendo que le pique. Esta es una prueba general convencional conocida en la técnica. Esta estimulación sólo produce una reacción local mínima en un paciente que ha sido desensibilizado.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un alérgeno para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la alergia mediante inyección directa del medicamento en un ganglio linfático de un individuo.

2. El uso de la reivindicación 1 en el que dicho ganglio linfático es un ganglio linfático axilar.

3. El uso de la reivindicación 1 en el que dicho ganglio linfático es un ganglio linfático inguinal.

4. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno se suministra a una célula presentadora de antígeno dentro del ganglio linfático.

5. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno se suministra a una célula del sistema inmune dentro del ganglio linfático.

6. El uso de la reivindicación 1, usando un dispositivo de ultrasonidos para controlar la localización de una aguja de inyección.

7. El uso de la reivindicación 1, usando un procedimiento radiológico para controlar la localización de una aguja de inyección.

8. El uso de la reivindicación 1 en el que el ganglio linfático es un ganglio linfático defectuoso.

9. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno es un extracto o una sustancia purificada.

10. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno se selecciona entre el grupo constituido por componentes alergénicos del veneno de abeja, veneno de avispa, veneno de hormiga roja, polen, mohos, anestésicos, suero, fármacos, animales, escamas de animales, cucarachas, ácaros del polvo, alérgenos de alimentos, hiedra venenosa, roble venenoso, zumaque venenoso, virus, bacterias, protozoos y látex.

11. El uso de la reivindicación 10 en el que el alérgeno es un alérgeno de alimentos y dicho alérgeno de alimentos se selecciona entre el grupo constituido por leche, pescado, marisco, cacahuetes, frutos secos, miel, frutas, huevos, soja y trigo.

12. El uso de la reivindicación 10 en el que el alérgeno es polen y el polen se selecciona entre el grupo constituido por polen de césped, polen de árboles y polen de hierbas.

13. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno se selecciona entre el grupo constituido por escamas de animales, excrementos de cucarachas y ácaros del polvo.

14. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno se selecciona entre el grupo constituido por una proteína recombinante y un péptido sintético.

15. Uso de un ácido nucleico que codifica un alérgeno para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la alergia mediante inyección directa del medicamento en un ganglio linfático de un individuo.

16. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno está contenido en un material de encapsulado.

17. El uso de la reivindicación 16 en el que el material de encapsulado se selecciona entre el grupo constituido por un material polimérico, un gel inyectable, un implante inyectable, un poliéster de polilactida-co-glicólida (PLGA) biodegradable, un polianhídrido, un polisacárido, un derivado de celulosa, una proteína y un poliacrilato.

18. El uso de la reivindicación 16 en el que el material de encapsulado está en forma de microesfera o nanoesfera.

19. El uso de la reivindicación 1 en la que el alérgeno comprende una sustancia de administración.

20. El uso de la reivindicación 1 en el que el medicamento comprende un adyuvante.

21. El uso de la reivindicación 20 en el que el adyuvante se selecciona entre el grupo constituido por alumbre, BCG, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato cálcico, un tensioactivo, una micropartícula de superficie activa, un producto bacteriano, una quemocina, una citoquina, una hormona, quitosano, almidón, alginato, un derivado de celulosa, una proteína, agua, una solución salina, una solución de dextrosa, albúmina o ácido nucleico.

22. El uso de la reivindicación 1 en el que el medicamento comprende una dosis de alérgeno de aproximadamente 0,01 μg a aproximadamente 10 μg.

23. El uso de la reivindicación 1 en el que el medicamento comprende una dosis de alérgeno de aproximadamente 0,1 μg a aproximadamente 50 μg.

24. El uso de la reivindicación 1 en el que la administración del medicamento causa una reacción asociada con la modulación de la respuesta alérgica.

25. El uso de la reivindicación 24 en el que la reacción puede detectarse mediante una prueba cutánea.

26. El uso de la reivindicación 24 en el que la reacción puede detectarse mediante una exposición controlada al alérgeno.

27. El uso de la reivindicación 24 en el que el alérgeno es veneno de abeja y en el que la reacción puede detectarse mediante una estimulación con el aguijón de la abeja.

28. El uso de la reivindicación 1 en el que la administración del medicamento modula una propiedad asociada con la modulación de la respuesta alérgica.

29. El uso de la reivindicación 1 en el que la administración del medicamento elimina una respuesta alérgica detectable.

30. El uso de la reivindicación 1 en el que la administración del medicamento disminuye una respuesta alérgica detectable.

31. El uso de la reivindicación 28 en el que la propiedad es una reducción de la sensibilidad al alérgeno o a agentes alergénicos de reacción cruzada.

32. El uso de la reivindicación 28 en el que la propiedad es un aumento del nivel de IgG4 específica del individuo de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 500%.

33. El uso de la reivindicación 28 en el que la propiedad es un descenso del nivel de IgG4 específica del individuo.

34. El uso de la reivindicación 28 en el que la propiedad es un cambio en las proporciones de IgG del individuo.

35. El uso de la reivindicación 28 en el que la propiedad es una carencia de un aumento significativo en el nivel de IgE específica del individuo.

36. El uso de la reivindicación 28 en el que la propiedad es un descenso en el nivel de IgE específico del individuo.

37. El uso de la reivindicación 28 en el que la propiedad es un cambio en los basófilos activados del individuo.

38. El uso de la reivindicación 28 en el que la propiedad es un cambio en el perfil de citoquinas del individuo.

39. El uso de la reivindicación 28 en el que la propiedad es un cambio en la prueba radioalergoabsorbente (RAST) del individuo.

40. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno es polen.

41. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno es veneno de abeja, avispa u hormiga roja.

42. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno es una escama de un animal.

43. El uso de la reivindicación 1 en el que el alérgeno es un componente alergénico de un ácaro del polvo.

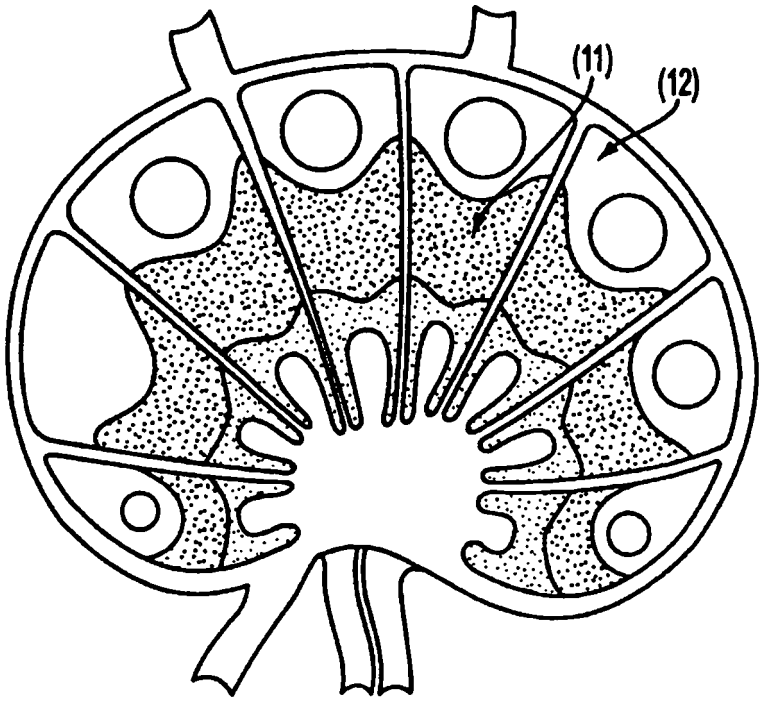


FIG. 1

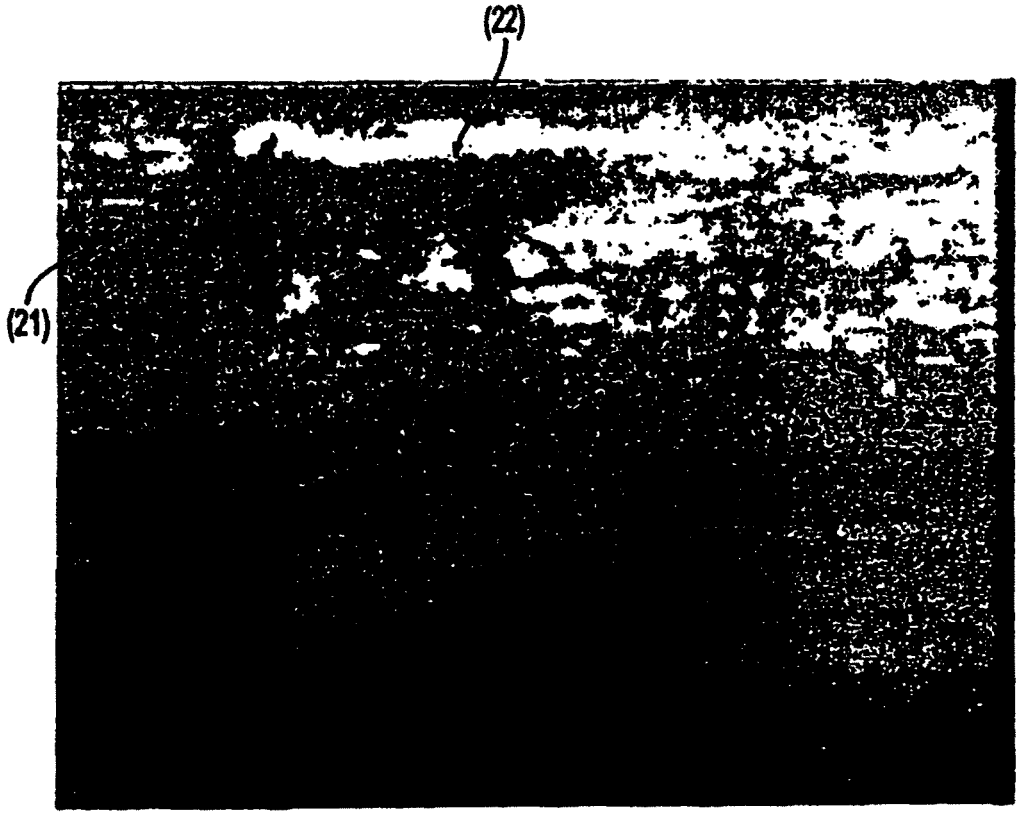


FIG. 2

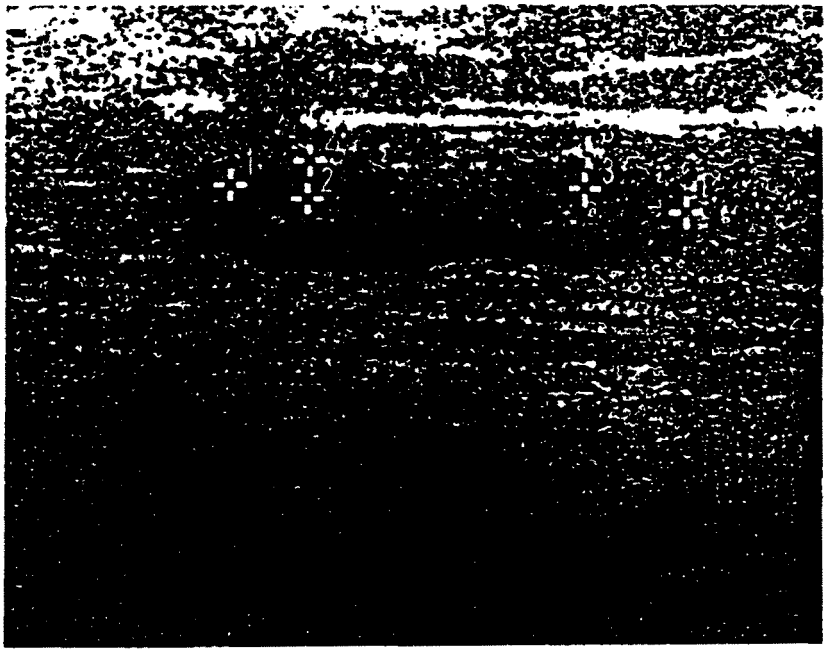


FIG. 3

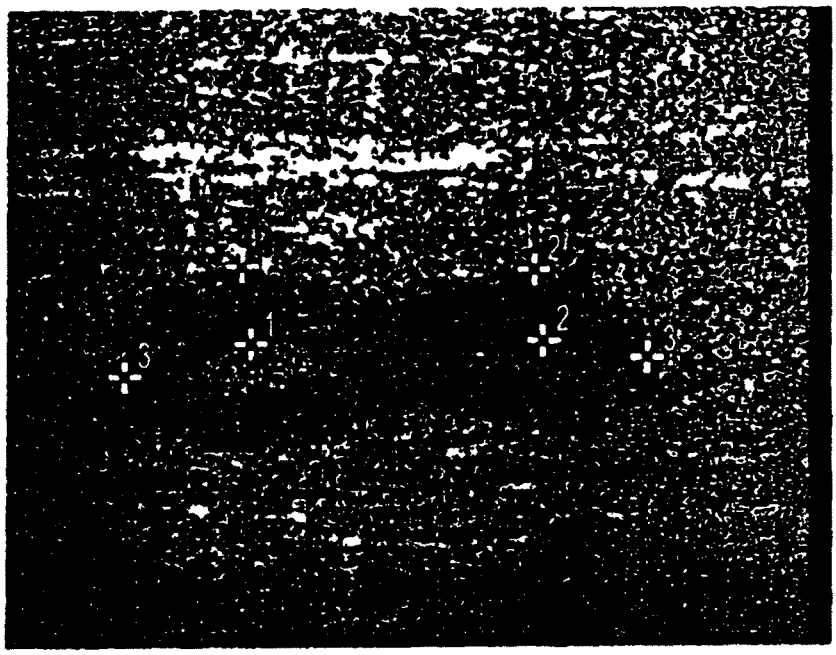


FIG. 4

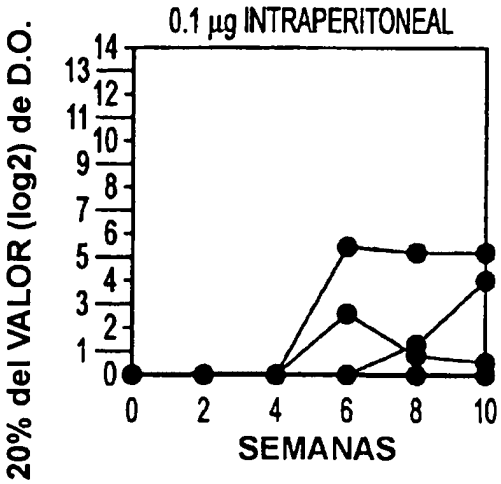


FIG. 5A

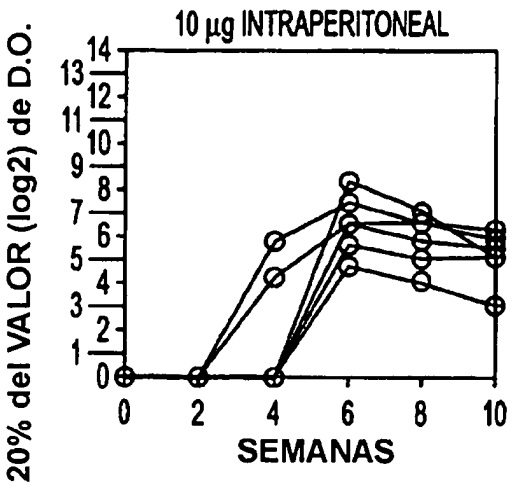


FIG. 5B

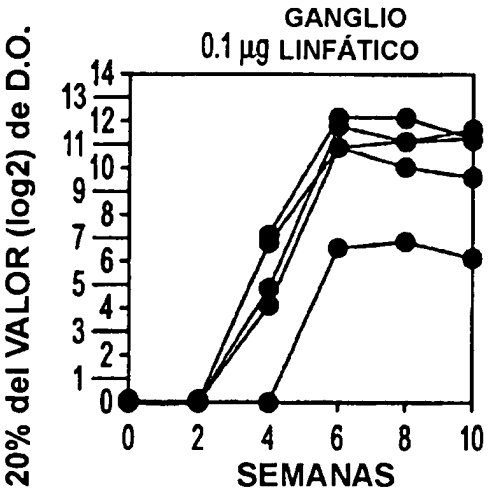


FIG. 5C

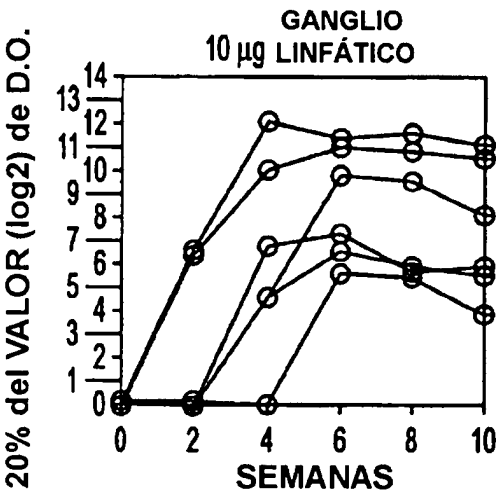


FIG. 5D

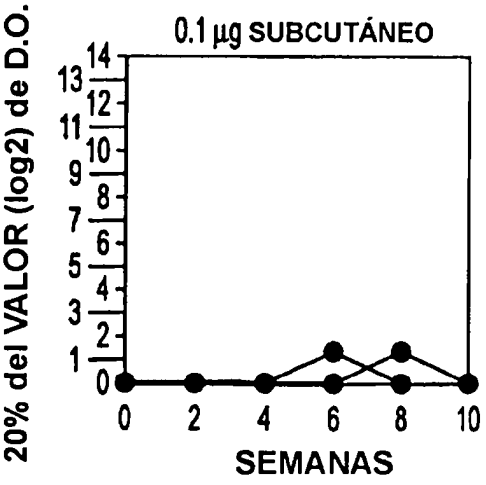


FIG. 5E

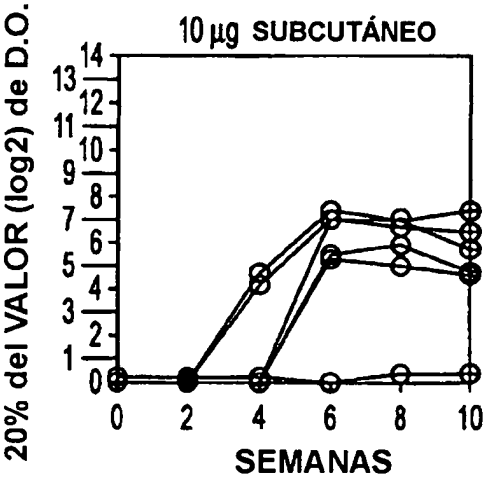


FIG. 5F

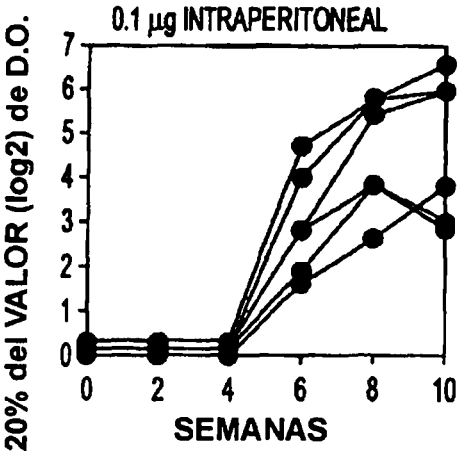


FIG. 6A

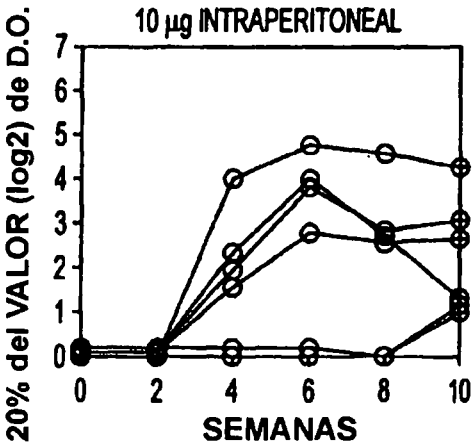


FIG. 6B

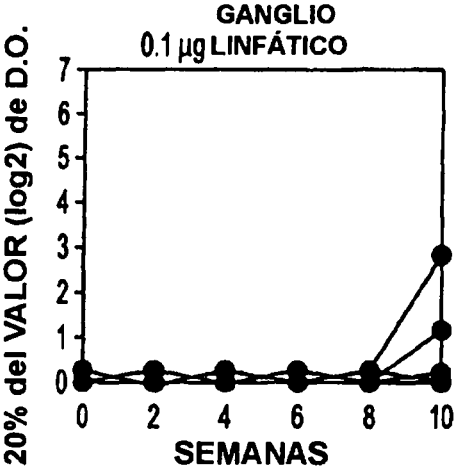


FIG. 6C

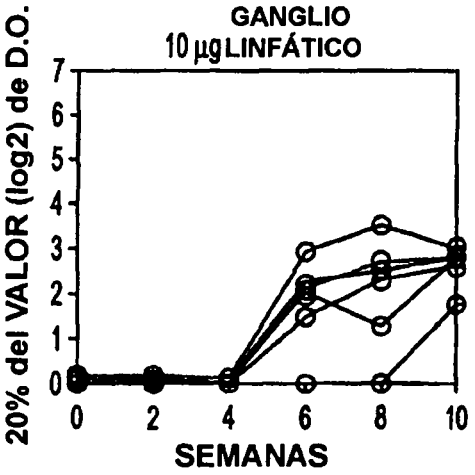


FIG. 6D

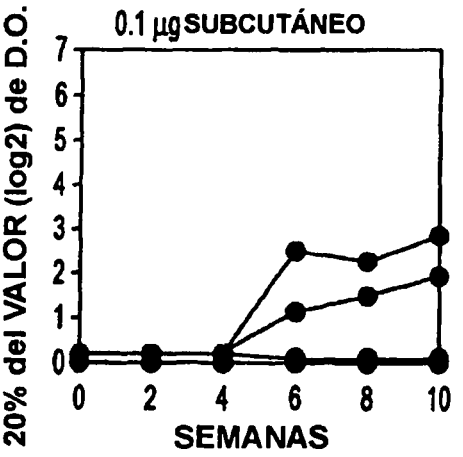


FIG. 6E

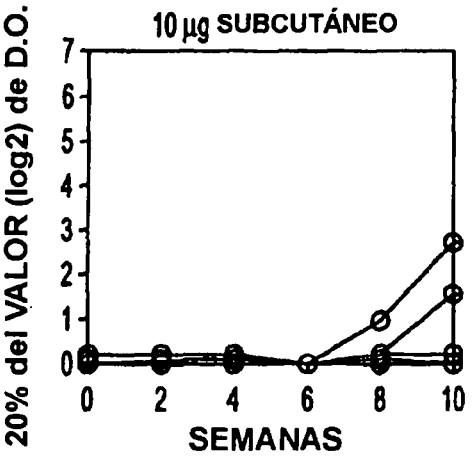


FIG. 6F

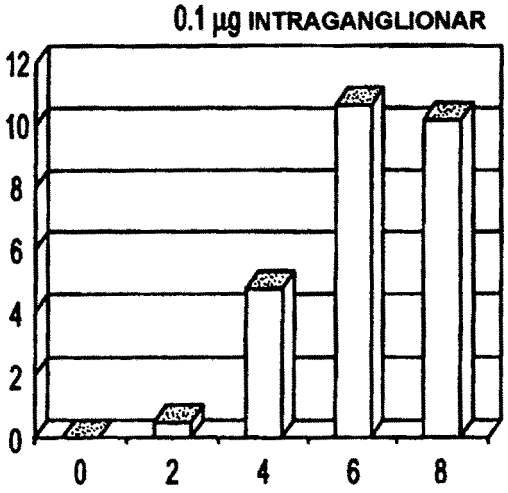

0.1 µg INTRAGANGLIONAR
12
10
8
6
4
2
0
0
2
4
6
8

FIG. 7A

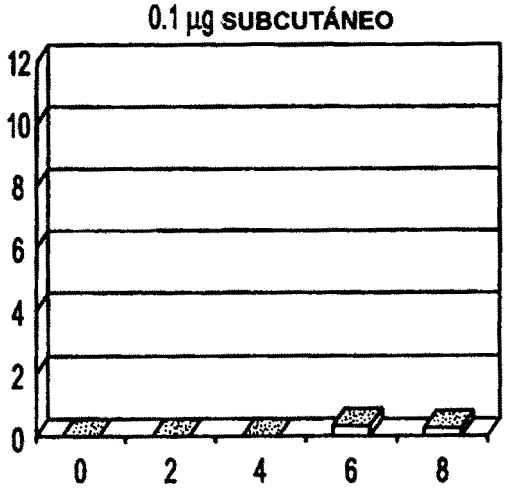

0.1 µg SUBCUTÁNEO
12
10
8
6
4
2
0
0
2
4
6
8

FIG. 7B

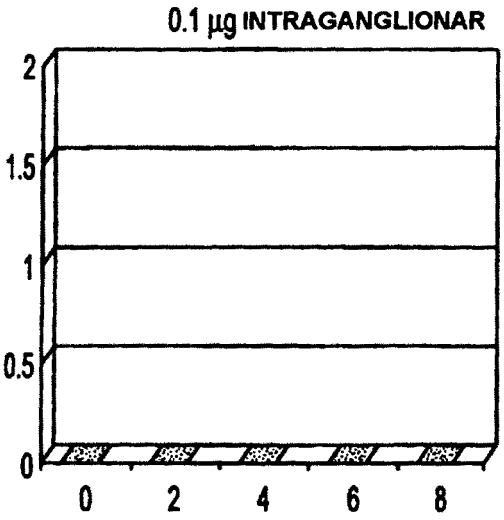

0.1 µg INTRAGANGLIONAR
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8

FIG. 8A

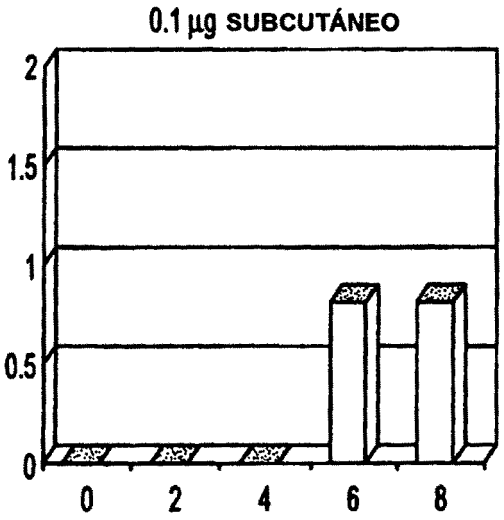

0.1 µg SUBCUTÁNEO
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8

FIG. 8B