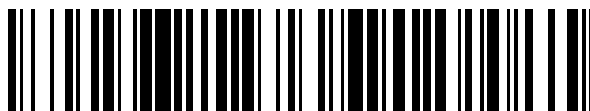


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 731**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03724819 .2**
96 Fecha de presentación: **08.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1520587**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2005**

54 Título: **COMPOSICIÓN DE VACUNA CONTRA LA ALERGIA, PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE LA MISMA Y USO DE LA MISMA EN EL TRATAMIENTO DE ALERGIAS.**

30 Prioridad:
08.05.2002 CU 912002

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2011

73 Titular/es:
**INSTITUTO FINLAY, CENTRO DE
INVESTIGACIÓN-PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y
SUEROS.
AVE 27 NO 19805 E/198 Y 202, LA CORONELA,
LA LISA
CIUDAD HABANA 13500, CU y
CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS**

72 Inventor/es:
**Lastre González, Miriam de San Juan;
Pérez Martín, Oliver Germán;
Labrada Rosado, Alexis;
Bidot Martínez, Igor;
Pérez Lastre, Jorge Ernesto;
Bracho Granada, Gustavo Rafael;
Del Campo Alonso, Judith Mónica;
Pérez Lastre, Dainerys Aleida;
Facenda Ramos, Elisa;
Zayas Vignier, Caridad;
Rodríguez Martínez, Claudio y
Sierra Gonzàlez, Victoriano Gustavo**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 368 731 T3

DESCRIPCIÓN

Composición de vacuna contra la alergia, procedimiento de producción de la misma y uso de la misma en el tratamiento de alergias.

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunología, específicamente a la rama de la inmuoalergia y, en particular, al uso de compuestos adyuvantes o transportadores capaces de modular la respuesta inmune a los alérgenos. El objetivo es inducir cambios en esta respuesta específica que puedan reducir o prevenir su efecto patógeno.

10 La alergia es una patología muy frecuente, principalmente en los países industrializados. En la alergia intervienen diversos mecanismos inmunopatológicos y particularmente la denominada hipersensibilidad anafiláctica de tipo I. La fisiopatogenia de la hipersensibilidad de tipo I se basa en la producción aumentada de IgE, un anticuerpo citotrófico. Los anticuerpos IgE se inducen contra sustancias extrañas, denominadas alérgenos, después de una primera exposición, denominada sensibilización.

15 Los anticuerpos IgE pueden unirse a los receptores de IgE presentes en la superficie de basófilos de la sangre y mastocitos de tejidos, prolongando su vida media desde pocas horas en la sangre a varios meses en tejidos. Los contactos posteriores de los alérgenos con los anticuerpos IgE unidos a células pueden provocar el entrecruzamiento de anticuerpos vecinos, lo cual desencadena una cascada de señales en el citoplasma celular, que conducen a la desgranulación celular y liberación de mediadores inflamatorios tales como histamina, serotonina y quininas.

20 Las enfermedades alérgicas más comunes son rinitis, asma y dermatitis atópica. El asma alérgica es un trastorno inflamatorio crónico. En la inmunopatogénesis del asma están implicados no solamente mecanismos dependientes de IgE (responsables de la respuesta anafiláctica de Tipo I), sino también linfocitos T y, particularmente, la denominada subserie de células Th2. Los linfocitos Th2 inducen y mantienen la respuesta inflamatoria por medio del reclutamiento y la activación de otras células y, particularmente, mediante la producción de IL-5, que es responsable del reclutamiento y la activación de eosinófilos. Los eosinófilos desempeñan un papel importante en el desarrollo de hiperreactividad bronquial, que es una característica esencial del asma.

25 Son alérgenos comunes el polen, los ácaros del polvo doméstico, mohos, fármacos, alimentos y pelo y caspa de animales. Los alérgenos de interior y especialmente, los ácaros del polvo doméstico, son una causa muy importante de alergia respiratoria y asma.

30 Las manifestaciones clínicas de los trastornos alérgicos normalmente se tratan con antihistamínicos, β -agonistas, cromoglicato sódico y corticosteroides. Generalmente, estos tratamientos son inadecuados debido a que son meramente sintomáticos y no influyen en la etiopatogenia de la enfermedad. Actualmente se reconoce ampliamente la necesidad de estrategias de tratamiento más eficaces, entre ellas, la inmunoterapia o vacunas terapéuticas específicas.

35 Tradicionalmente, se ha usado ampliamente la terapia de hiposensibilización con extractos de alérgenos (denominada también inmunoterapia específica) en el tratamiento de enfermedades alérgicas. En este tipo de tratamiento, a los pacientes se les administran inyecciones subcutáneas periódicas de los alérgenos ofensivos específicos. Se empieza inyectando pequeñas dosis de alérgenos y, si no aparecen reacciones alérgicas, se aumenta la dosis. Las inyecciones se administran al principio con una frecuencia semanal; después, las dosis se aumentan gradualmente hasta alcanzar una dosis de mantenimiento con una frecuencia mensual o semimensual. Este tratamiento debe mantenerse durante varios años (Informe de Posición de la OMS. Inmunoterapia con Alérgenos: Vacunas Terapéuticas contra Enfermedades Alérgicas (Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines against Allergic Diseases). Ginebra, enero de 1998).

45 A pesar de que el procedimiento se considera relativamente eficaz para algunas enfermedades alérgicas, la inmunoterapia se ha cuestionado debido a razones de seguridad. Durante este tratamiento, el paciente puede sufrir reacciones anafilácticas graves, que pueden llegar a ser mortales. Además, el elevado número de inyecciones a administrar, que puede ser de aproximadamente 100-200 en 3 años, constituye un serio inconveniente para su aplicación práctica. El escaso cumplimiento por parte del paciente y el abandono prematuro del tratamiento son causas frecuentes de la falta de eficacia esperada.

50 En los últimos años, ha habido un gran progreso en la comprensión de los mecanismos de la inducción de la respuesta inmune de IgE en sujetos alérgicos. La producción de IgE por linfocitos B la dirigen mecanismos específicos de la respuesta inmune celular Th2 y, particularmente, se induce por una superproducción de IL-4 por células Th2. Las células Th2 no sólo están implicadas patológicamente por su papel regulador (IL-4 induce el cambio de clase a IgE en linfocitos B, mediado por una señal de contacto proporcionada por los linfocitos T), sino que también participan directamente en la fase efectora de la respuesta inflamatoria alérgica de tipo retardado y en la inflamación crónica asmática.

55 La exposición a alérgenos ambientales, además de la propia predisposición genética, constituye el fenómeno principal del proceso de sensibilización alérgica y produce el desencadenamiento de reacciones alérgicas.

Aún no se ha explicado totalmente el mecanismo inmunológico responsable de la mejoría clínica de los pacientes durante la inmunoterapia con alérgenos. No obstante, se sabe que tienen lugar varios cambios inmunológicos asociados a una disminución a largo plazo de la IgE específica de alérgeno: hay una disminución de la secreción de IL-4 e IL-5 y un aumento de los niveles de IFN- γ e IgG. Estos cambios indican una disminución del patrón de respuesta Th2, como una posible consecuencia de la inducción de un patrón Th1 simultáneo no patogénico (Informe de Posición de la OMS. Inmunoterapia con Alérgenos: Vacunas Terapéuticas contra Enfermedades Alérgicas (Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines against Allergic Diseases). Ginebra, enero de 1998).

Los patrones de respuesta Th1/Th2 se distinguen entre sí en primer lugar por el patrón típico de citocinas, secretadas por células Th: concretamente IFN- γ e IL-2 por Th1 e IL-4 e IL-5 por Th2 (Mossman, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. To, y R. L. Coffman. 1986. Two types of murine T helper cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357). Por otro lado, también es posible determinar el tipo de respuesta inducida determinando los perfiles de la clase/subclase de IgE en suero. Por lo tanto, los patrones Th1 murinos inducen anticuerpos preferentemente de la subclase IgG2 (dependiente de IFN- γ), mientras que Th2 induce IgE y la subclase IgG1 (dependiente de IL-4). En seres humanos, Th1 está asociada a anticuerpos IgG1/IgG3 y Th2 a IgE.

Aunque la aparición y el desarrollo de las alergias se produce por factores ambientales, el papel fundamental en la propensión de un individuo a desarrollar una respuesta Th2/IgE es de orden genético (Holgate ST. *Environmental Genetic and interaction in allergy and Asthma. J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1139-1146). Por lo tanto, los descendientes de padres alérgicos desarrollarán una enfermedad alérgica con una mayor frecuencia que los niños de padres no alérgicos. Se ha estimado que esta frecuencia es del 75, 50 y 25 % si son alérgicos ambos progenitores, la madre o el padre, respectivamente). Esto significa que aplicando un sistema de diagnóstico a los padres, puede predecirse con una alta probabilidad el comportamiento de un individuo dentro de la población. Adicionalmente, es bien sabido que el establecimiento de un patrón patológico Th2 se produce en los primeros 6-24 meses de vida. Ciertos factores ambientales tales como la exposición a infecciones bacterianas pueden afectar positivamente a la aparición de enfermedades, induciendo un patrón Th1, que regulan negativamente el patrón Th2 alérgico (Holt PG, *Programming of Allergen Specific Th-memory during Childhood. Proceedings XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Sydney 2000. Allergy Clin Immunol International Suppl.* 1, 2000 págs. 83-85). Estos descubrimientos sugieren la posibilidad de diseñar vacunas antialérgicas profilácticas que podrían impedir el establecimiento de una respuesta Th2 a alérgenos, en la primera fase de la infancia. Estas vacunas podrían basarse en adyuvantes Th1, que idealmente deberían ser eficaces durante el periodo de lactancia materna.

Se han intentado diversas estrategias para mejorar la inmunoterapia con alérgenos, dirigidas a reducir sus aspectos negativos, conservando o extendiendo sus efectos beneficiosos. Particularmente, se sabe que se han usado diversos procedimientos para modificar los alérgenos de manera que pueda reducirse su alergenidad (es decir, su capacidad de ser reconocidos por anticuerpos IgE) y la capacidad de inducir anticuerpos IgE después de la inmunización, así como aumentar su inmunogenicidad (es decir, su capacidad de inducir una respuesta terapéutica o posiblemente protectora). Entre éstos se encuentran los procedimientos físicos por adsorción de alérgenos, que crean un efecto de depósito (adyuvantes), o procedimientos químicos cuyo objetivo es modificar las moléculas de alérgeno por medio de enlaces covalentes con otros compuestos o entre ellos mismos.

Se han usado diversos agentes químicos, entre ellos: Tirosina (Patente N° GB 1.377.074), Éster de Tirosina (Patente de Estados Unidos N° 4.428.932); Liposomas (Solicitud de Patente WO 89/10753); Monofosforil Lípido A (MLA) (Patente de Estados Unidos N° 5.762.943); Saponina (Patente de Estados Unidos N° 4.432.969) y los tradicionales: Hidróxido de Aluminio y Fosfato Cálcico.

Entre los agentes químicos que se han usado para la polimerización de alérgenos se encuentran Formaldehído (Marsch DG y col. *Studies on allergoids from naturally occurring allergens. III Preparation of Ragweed pollen allergoids by aldehyde modification. J. Allergy Clin. Immunol.* 1981; 68: 449-59); Alginato (Corrado OJ y col. *Allergy* 1989; 44: 108-5) y Glutaraldehído (Patente N° GB 1.282.163). Además, se han usado: MPEG (Dreborg y col. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1990; 6: 315-65) y conjugados de polisacáridos (Solicitud de Patente Europea N° EP 3497 008 A2).

En algunos casos, estas soluciones (por ejemplo, alérgenos polimerizados con glutaraldehído, con alumbre como adyuvante, Grammer y col., *Modified forms of allergen immunotherapy, J Allergy Clin Immunol* 1985; 44: 108-15) podrían aumentar los títulos de IgG específica de alérgeno en modelos animales. Sin embargo, el aumento de esta clase de anticuerpo no implica necesariamente una mejoría clínica del paciente, principalmente si se produce un aumento paralelo de anticuerpos IgE. De hecho, algunas subclases de IgG (IgG1 en ratones e IgG4 en seres humanos) también están implicadas en diferentes relaciones alérgicas debido a su capacidad de unirse por sí mismas transitoriamente a la superficie de mastocitos. Por otro lado, las pruebas clínicas en seres humanos indican que el aumento de anticuerpos IgG no está correlacionado directamente con la mejoría clínica, lo que sugiere que estos anticuerpos desempeñen solamente un papel secundario en el mecanismo regulador, inducido por el tratamiento (Rak S. Lowhagen O., Venge P. *Bronchial The effect of immunotherapy on hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 470-80 y Jutel M, Müller Or, Fricker M, Rihs S, Pichler W, Dahinden C. *Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene*

generation in human blood basophiles. Clin Exp Immunol 1996; 12: 1112-18).

Aunque los alérgenos modificados químicamente (denominados alergoides) presentan algunas ventajas en lo que se refiere a la disminución de reacciones adversas secundarias durante el tratamiento en comparación con los extractos de alérgenos tradicionales, no producen una mejoría clínica significativa (Bousquet y col. J. Allergy Clin. Immunol. 1989; 84: 546-56 y Grammer y col. J Allergy Clin Immunology 1985; 76: 397-401). Otro inconveniente de los alergoides, usados hasta ahora en ensayos clínicos (modificados por Glutaraldeído o Formaldehído), es la imposibilidad práctica de obtener una composición estandarizada, dado que los productos finales se obtienen por medio de reacciones químicas que parten de extractos de alérgenos, que son mezclas heterogéneas de polipéptidos y otras biomoléculas. En estas reacciones no puede evitarse que se formen especies moleculares con diferentes grados de polimerización o modificaciones químicas, que pueden constituir subproductos indeseados y difíciles de eliminar.

El uso de Hidróxido de Aluminio se ha empleado solamente para reducir la cantidad de inyecciones necesarias para obtener el mismo efecto que con los alérgenos sin adyuvante, que se atribuye a sus efectos de depósito y de liberación lenta. No obstante, se sabe que este adyuvante estimula la producción de IgE, tanto en animales como en seres humanos, induciendo un patrón Th2 típico que posiblemente podría reforzar la respuesta alérgica patógena, durante su administración.

También se han usado Fosfato Cálcico y Tirosina como adsorbentes para crear un efecto de depósito y liberación lenta de los alérgenos. Sin embargo, estas formulaciones no han mostrado ventajas significativas en comparación con los extractos acuosos o con alumbre como adyuvante, en lo que se refiere a la eficacia o seguridad del tratamiento (Altintas DU y col. Comparison between the use of adsorbed and aqueous immunotherapy material in Dermatophagoides pteronyssinus sensitive asthmatic patients. Allergologie et Immunopathologie 1999; 27(6): 309-317).

Ninguna de las soluciones previamente mencionadas existentes en el momento actual ha podido conseguir una modulación inmune completamente eficaz (expresada como la inhibición o reducción del patrón Th2 o inducción de Th1) ni en animales ni en seres humanos y no se ha mostrado eficacia clínica en pacientes usando una cantidad de inyecciones reducida.

El uso de liposomas que contienen alérgenos se ha descrito en la Solicitud de Patente WO 89/10753. Se considera que los liposomas, además de crear un depósito y reducir la alergenidad del producto, pueden ejercer influencia sobre los mecanismos de la presentación de antígenos al sistema inmune, debido a su naturaleza lipídica y en forma de partículas (Informe de Posición de la OMS. Inmunoterapia con Alérgenos: Vacunas Terapéuticas contra Enfermedades Alérgicas (Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines against Allergic Diseases). Ginebra, enero de 1998). Sin embargo, esta estrategia tiene diversos inconvenientes que han impedido una amplia introducción en la práctica clínica. Entre éstos se encuentra la falta de estabilidad de estas formulaciones y la disponibilidad de una tecnología para la inclusión de alérgenos en liposomas de una manera consistente. La falta de estabilidad de la formulación de liposomas durante el almacenamiento o la administración al paciente tiene graves implicaciones en la seguridad del tratamiento, ya que la posible liberación incontrolada de alérgenos a partir de liposomas puede producir reacciones anafilácticas graves, de manera similar a los alérgenos en forma acuosa. Además, no se han obtenido pruebas definitivas de la inducción de una respuesta inmune eficaz que afecte al equilibrio Th1/Th2 o que induzca un modelo no patológico o protectogénico.

Se han intentado estrategias más recientes para usar formulaciones de alérgenos con inductores adyuvantes de respuesta Th1 tales como Monofosforil Lípido A (MLA) (Patente de Estados Unidos Nº 5.762.943) y Proteínas de Choque Térmico (HSP) también conocidas como Proteínas de Estrés Micobacteriano que se describen en la patente WO9823735. Se ha demostrado que el MLA, una variante destoxificada de LPS, reduce los niveles de IgE específica y aumenta los niveles de IgG, en modelos experimentales de ratón. Sin embargo, no se ha demostrado que pueda reducir eficazmente el componente celular Th2 de la respuesta alérgica. Por lo tanto, su uso se limitaría estrictamente a las enfermedades alérgicas para las cuales el mecanismo de hipersensibilidad de tipo I es el principal, lo que excluiría el asma. Otro inconveniente importante es que, a pesar del hecho de que se ha atenuado la toxicidad del LPS, no se ha eliminado completamente (Baldrick P y col. Vaccine 20, 2002 737-743), lo que podría limitar su uso en niños pequeños. En el caso de HSP, no se han proporcionado pruebas experimentales que confirmen que los alérgenos clínicamente relevantes mezclados o conjugados con estas proteínas puedan producir una desviación de la respuesta Th2 específica de alérgeno, ni en modelos animales ni en seres humanos.

Se ha descrito el uso de proteoliposomas derivados de la membrana externa de bacterias Gram negativas para formulaciones de vacuna profilácticas contra enfermedades infecciosas, por Ruegg CL y cols. (Preparation of proteosome-based vaccines. J Immunological Methods 1990; 135: 101-9); Lowell y cols. (Proteosome-Lipopeptide Vaccines: Enhancement of for Immunity Malaria CS Peptides. Science 1988; 240: 800-2); y también en la Patente de Estados Unidos Nº 5.597.572. En este último caso, el núcleo principal es un proteoliposoma o vesícula de membrana externa (VME) derivada de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B. Se considera que su estructura en forma de partículas, las pequeñas cantidades de lipo-oligosacáridos (LPS) incorporadas en la VME; el polisacárido C; la composición lipídica y la absorción en Alumbre, son relevantes para su inmunogenicidad y protectogenicidad demostradas en seres humanos.

A pesar de contener LPS, esta formulación de vacuna no produce efectos tóxicos ni en seres humanos ni en animales, lo que se atribuye a la estructura y composición peculiares de las VME. Por otro lado, podría conservarse el efecto inmunomodulador y adyuvante del LPS.

La vacuna anti-meningocócica, basada en este proteoliposoma, se ha aplicado con éxito en más de 50 millones de dosis, demostrando que es segura, no reactogénica y eficaz para proteger contra *N. meningitidis* de los serogrupos B y C. Además, puede aplicarse de manera segura durante el periodo de lactancia materna. Se ha demostrado que puede transformar el antígeno del polisacárido C T-independiente en uno T-dependiente. Esta vacuna induce un patrón Th1 preferente en seres humanos y animales, caracterizado por la inducción de linfoproliferación; anticuerpos IgG anti-VME (subclase IgG1 en seres humanos e IgG2a en ratones); IFN α , IL-2 e IL-12, tanto a nivel de proteínas como de ARNm. No induce IgE anti-VME, ni aumenta los niveles totales de IgE, ni IL-4, IL-5; tanto a nivel de proteínas como de ARNm (Infect Immun. 2001, 69(72001): 4502-4508). La respuesta inducida por la vacuna, como es normal para la inmunidad adaptativa, es específica para antígenos bacterianos contenidos en producto y, por lo tanto, no existen pruebas de inducción de una respuesta inmune hacia alérgenos comunes bien conocidos.

El objeto de la presente invención es obtener una composición farmacéutica para fines terapéuticos y profilácticos, basándose en el uso de proteoliposomas bacterianos. Esta composición, una vez aplicada en pacientes alérgicos, puede transformar la respuesta Th2 alérgica, inducida por el alérgeno, hacia una respuesta Th1 celular. La invención también se refiere al esquema de inmunización que usa esta composición de vacuna. También es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que pueda prevenir la aparición y desarrollo de la enfermedad alérgica en niños con historial familiar atópico.

Esta composición puede contener uno o varios alérgenos, que pueden acoplarse a los proteoliposomas o administrarse simultáneamente con ellos, induciendo una respuesta inmune terapéutica o protectora específica frente al alérgeno. Esta respuesta se caracteriza por una producción disminuida de anticuerpos IgE en comparación con la inmunoterapia tradicional, la no inducción de IL-5, así como la inducción de la subclase de anticuerpos IgG1 (en seres humanos) e IgG2a (en ratones), e IFN- γ (en ambos). Estas características prueban la inducción de una respuesta inmune de tipo Th1 y la transformación de la respuesta Th2 alérgica en una respuesta Th1 celular.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar el procedimiento para acoplar uno o más alérgenos a proteoliposomas y a otros adyuvantes, así como proporcionar una composición farmacéutica apropiada para su administración por vía parenteral.

La novedad de la invención es, en primer lugar, el uso de proteoliposomas derivados de proteínas de la membrana externa como se describe en las reivindicaciones. Estos proteoliposomas (en solitario o junto con un polisacárido) se acoplan de una manera covalente o no covalente a una o varias proteínas alérgicas y después se administran a sujetos alérgicos.

Tiene una novedad particular, que esta composición farmacéutica induce una modulación de la respuesta inmune específica frente a los alérgenos incluidos en ella, hacia un patrón Th1 no patológico y protector, usando solamente dos inyecciones.

Otro nuevo aspecto es la aplicación profiláctica de la composición farmacéutica en la descendencia de padres alérgicos o en individuos atópicos precozmente diagnosticados.

También es nuevo el procedimiento usado para acoplar de manera no covalente los principales componentes de la formulación y particularmente: proteoliposomas a alérgenos, así como el uso de alérgenos purificados para este fin.

En la presente invención se usan los proteoliposomas o VME, purificados a partir de cultivos de bacterias *N. meningitidis*, y particularmente de *N. meningitidis* B, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.597.572.

En la presente invención, se usan alérgenos de naturaleza proteica o glicoproteica derivados de ácaros domésticos. Los alérgenos pueden obtenerse a partir de materiales de fuentes alérgicas naturales usando procedimientos de extracción y purificación bien conocidos o pueden obtenerse de manera recombinante por clonación y expresión en microorganismos o células de organismos superiores. Como alternativa, pueden usarse polipéptidos sintetizados químicamente de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de los alérgenos nativos. Particularmente, se prefieren alérgenos respiratorios: en primer lugar, procedentes de ácaros del polvo doméstico pertenecientes a las familias *Pyroglyphidae* o *Glyciphagidae*, especialmente pertenecientes al género *Dermatophagoides* o *Blomia* y específicamente a las especies *Dermatophagoides siboney*, *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*. Los alérgenos purificados de estas especies de ácaros se obtienen preferentemente a partir de cualquier extracto alérgico disponible en el mercado, que se somete en primer lugar a liofilización o concentración por ultrafiltración hasta un contenido de proteínas de 10-100 mg/ml, y después a precipitación salina en solución de sulfato amónico al 50-100 %. El sedimento se reconstituye en solución acuosa y se fracciona por medio de cromatografía de filtración en gel usando una de las siguientes matrices: Sephacryl S-100, Sephacryl S-200, Sephacryl S-300 o Superdex 75. Se recoge el pico correspondiente a un peso molecular de 10-60 kDa. Esta fracción contiene principalmente alérgenos principales del Grupo 1 (glicoproteína de 25 kDa: Der s 1, Der p 1, Der f 1) y del Grupo 2 (proteína de 15 kDa: Der s 2, Der p 2, Der f 2). Como alternativa, puede seguirse un procedimiento de

purificación separado para cada alérgeno principal, usando preferentemente cromatografía de afinidad con AcM anti-Grupo 1 y Grupo 2; después, pueden añadirse los dos componentes a la formulación para acoplarse a los proteoliposomas o, como alternativa, pueden acoplarse al mismo por separado.

El acoplamiento de los dos componentes básicos (alérgeno y proteoliposoma) se realiza por enlace covalente o no covalente. La elección puede realizarse teniendo en cuenta las características de cada alérgeno particular. Para el acoplamiento no covalente, los alérgenos de ácaros se introducen en proteoliposomas a una proporción de 0,1-1 μ g por 10 μ g de proteoliposoma. Este procedimiento de acoplamiento aprovecha las interacciones hidrófobas y lipófilas entre los dos componentes; el proceso se realiza por medio de agitación mecánica a una velocidad de rotación de 60 a 600 rpm, durante 30-60 minutos. La mezcla obtenida puede administrarse directamente en solución acuosa o adsorberse en gel de hidróxido de alumbre. En el último caso, el alérgeno también puede adsorberse en el gel antes de acoplarse a proteoliposomas o, preferentemente, añadirse después de la absorción de los proteoliposomas en el gel. La cantidad de hidróxido de alumbre debe ser de 10 a 25 veces la cantidad de proteoliposoma, guardando la proporción mencionada anteriormente entre el contenido de alérgeno y proteoliposoma. El proceso de adsorción en el gel de alumbre se realiza por medio de agitación a 60-600 rpm y a valores pH que varían de 6 a 8.

La eficacia de la adsorción del alérgeno en el gel de Alumbre puede supervisarse usando ELISA-AcM, específico para alérgenos principales, por ejemplo ELISA anti-Der s 1 (Sewer y col. Int Arch Allergy Immunol 2000; 123: 242-248) y ELISA anti-Grupo 2 (Heymann PW, Chapman MD y col. J Allergy Clin Immunol 1989; 83: 1055 -1067).

El acoplamiento del alérgeno al proteoliposoma puede realizarse también mediante un enlace covalente, usando un agente de entrecruzamiento o espaciador, que puede acoplarse a los grupos amino disponibles en el proteoliposoma, seguido del acoplamiento del grupo espaciador Maleimida a los grupos Sulfhidrilo (SH) libres sobre la molécula de alérgeno. Dichos grupos SH libres están presentes en las proteínas de alérgenos principales de ácaros (Grupo 1 y Grupo 2), sin embargo, también pueden inducirse en otros alérgenos reduciendo los puentes disulfuro o por derivatización de proteínas por procedimientos químicos bien conocidos. Los conjugados obtenidos se purifican después por diálisis o ultrafiltración y finalmente por cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-300 o Superdex 200) para eliminar los reactivos de conjugación así como los alérgenos no unidos. Las moléculas de alérgeno deben constituir entre el 1 y el 10 % de la masa total del conjugado para inducir una respuesta inmune adecuada. Los conjugados se administran mediante una vía inyectable en un excipiente acuoso apropiado o se adsorben en gel de Hidróxido de Alumbre o Hidróxido de Aluminio como adyuvante de depósito.

La presente invención también incluye la conjugación, por el procedimiento descrito anteriormente, de restos lipófilos tales como ácidos grasos bipolares de 16 a 20 carbonos a los alérgenos, destinada a facilitar su incorporación no covalente en el proteoliposoma.

Como alternativa, la composición de vacuna puede incluir otros antígenos que no influyen en el patrón celular inducido y refuerzan la respuesta esperada al alérgeno. Para este fin pueden usarse polisacáridos, y particularmente el polisacárido C de *N. meningitidis*. Éstos se añaden de manera no covalente a la formulación en una proporción de 0,5 a 4 veces la cantidad del proteoliposoma.

La presente invención también comprende el uso de alérgenos de naturaleza de lipopolisacáridos tales como Determinantes de Carbohidratos de reacción Cruzada (CCD), encontrados en algunas fuentes de alérgenos de polen y de alimentos vegetales (Aalberse, RC. Crossreactivity of IgE antibodies to allergens. Allergy 56 (6), 2001, págs. 478-490). En este caso, los alérgenos se añaden a la formulación de la misma manera que se ha descrito para el polisacárido C de *N. meningitidis*.

Inesperadamente, la administración de esta composición de vacuna por vía parenteral solamente con dos dosis, indujo, no sólo una respuesta Th1 específica frente a los antígenos de proteoliposoma, como se sabía previamente, sino también una respuesta Th1 similar dirigida contra los alérgenos incluidos en la formulación. Sorprendentemente, esta respuesta Th1 prevalece, a pesar de usar Hidróxido de Alumbre en la formulación, conservándose el efecto de depósito. Esta respuesta se caracteriza por un patrón de citocinas con altos niveles de IFN- γ y sin inducción de IL-5, y también, por inducción de anticuerpos IgG2a específicos de alérgeno y reducción de anticuerpos IgE e IgG1 en ratones. La administración de esta composición no afecta a la respuesta preexistente contra los antígenos bacterianos, inducida por inmunizaciones previas.

La solución propuesta tiene las siguientes ventajas:

El efecto inmunológico inducido por esta composición de vacuna contrarresta: tanto la respuesta de hipersensibilidad anafiláctica de tipo I (reducción de IgE e IgG1) como las reacciones alérgicas crónicas e inflamatorias de tipo retardado (reducción de IL-5), lo que hace que sea eficaz en el tratamiento del asma. El efecto terapéutico se atribuye a la presentación de alérgenos al sistema inmune en un contexto no alergénico, y esto se consigue con una cantidad reducida de inyecciones y en un tiempo más corto en comparación con la inmunoterapia tradicional con extractos de alérgenos. Dicho efecto se usa ventajosamente, no solamente en el tratamiento de pacientes alérgicos, sino que también permite prevenir el desarrollo de la enfermedad en individuos con un estado alérgico en sus primeras fases o prevenir la aparición de nuevas sensibilizaciones alérgicas a otros alérgenos.

El efecto inmunológico de proteoliposomas como adyuvantes modificadores inmunes es eficaz y seguro en los primeros meses de vida, durante el periodo de lactancia materna. Esto hace posible la administración de la vacuna en niños a esta edad con un propósito profiláctico, antes de que la enfermedad aparezca y se desarrolle. Es particularmente útil para niños con una historia familiar alérgica y, por lo tanto, con una alta probabilidad de ser alérgicos.

La adsorción de los componentes activos en Hidróxido de Aluminio como adyuvante de depósito reduce la alergenicidad de la formulación (es decir, la capacidad de unión a IgE) más de 10 veces en relación con una dosis similar de alérgeno acuoso. Esto implica una reducción considerable del riesgo de reacciones anafilácticas graves durante su administración. Además, la adsorción en el gel contribuye a prolongar la estabilidad durante la vida útil de la formulación disminuyendo la cinética de las reacciones químicas que posiblemente pueden causar la degradación de los componentes activos.

El uso de alérgenos purificados, y particularmente de alérgenos de ácaros purificados del género *Dermatophagoides*, incluyendo alérgenos de los Grupos 1 y 2, facilita la estandarización de la composición del producto. Entonces, es posible determinar y adecuar de manera precisa el contenido de alérgeno en la formulación y evaluar la eficacia de su acoplamiento al proteoliposoma y adsorción en gel de Hidróxido de Aluminio. Además, en el caso del acoplamiento covalente, es posible separar fácilmente subproductos no deseados (tales como polímeros alérgeno-alérgeno) del compuesto activo (conjugado proteoliposoma-alérgeno) gracias a la gran diferencia en peso molecular entre los dos componentes. Esta separación puede realizarse usando cromatografía de exclusión por tamaño disponible en el mercado. La tecnología puede aplicarse a alérgenos de diferente naturaleza, siendo posible el uso de varios alérgenos en una misma formulación.

Otra ventaja es la ausencia de toxicidad en el producto, a pesar de contener pequeñas cantidades de LPS que, por otro lado, conserva su efecto inmunogénico. Esto lo hace apropiado para una administración segura a seres humanos y particularmente a niños pequeños.

Los proteoliposomas además transforman los antígenos T-independientes, tales como carbohidratos, en antígenos T-dependientes. Esta característica también puede aplicarse ventajosamente a alérgenos de naturaleza de polisacáridos tales como CCD.

La presente invención se describirá a lo largo de los siguientes ejemplos específicos.

Ejemplo 1. Obtención y purificación de alérgenos de ácaros

Los alérgenos se obtienen a partir de un cultivo de ácaros enteros, que contiene ácaros muertos, escamas, partículas fecales, así como ingredientes del medio de cultivo de bajo peso molecular. Los alérgenos se extraen de una de las siguientes soluciones: bicarbonato amónico, bicarbonato sódico, solución salina tamponada con fosfato o solución salina, con un valor de pH próximo al fisiológico. El extracto bruto se clarifica por centrifugación y filtración y se retiran los componentes de bajo peso molecular por medio de cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-25) o diafiltración (valor límite: 5-10 kD) o ambas técnicas. Después, el producto se concentra por ultrafiltración y se liofiliza para garantizar su estabilidad. Para purificar adicionalmente los alérgenos, el extracto liofilizado se resuspende en solución acuosa y se somete a precipitación salina en solución de sulfato amónico al 50 - 100 %. El sedimento se resuspende de nuevo en agua y se fracciona por cromatografía de filtración en gel usando Superdex 75. Se recoge el pico intermedio, que corresponde a un intervalo de pesos moleculares de 10-60 kDa. Esta fracción contiene principalmente alérgenos principales del Grupo 1 (25 kDa) y del Grupo 2 (15 kDa). Finalmente, la fracción recogida se liofiliza de nuevo para reconstituirse en una concentración apropiada para acoplarse al proteoliposoma.

Ejemplo 2. Obtención del proteoliposoma

Se comienza a partir de un cultivo de *N. meningitidis* B. La biomasa se recoge por centrifugación y se somete a un proceso de extracción con detergente, enzimas y tratamiento ultrasónico. Los desechos celulares se retiran por centrifugación y el sobrenadante se somete a un proceso de digestión con nucleasas para eliminar los ácidos nucleicos. El extracto se recupera por medio de ultracentrifugación, se resuspende en una solución de detergente y se purifica eliminando el resto de componentes de peso molecular bajo y medio usando cromatografía de exclusión molecular. Los proteoliposomas obtenidos de esta manera, contienen menos del 10 % de ácidos nucleicos y aproximadamente un 10 % de LPS, incluidos en su estructura; pero ninguno en una forma libre. Opcionalmente, se añade el polisacárido capsular, obtenido a partir de *N. meningitidis* serogrupo C de acuerdo con Gold y Gotschlich (Gold y col., 1969-1970, WHO Bull. 45: 279-282 y Gotschlich y col., 1969, J. Exp. Med. 129: 1349-1365) en una proporción de 0,5 a 4 veces el contenido de proteoliposoma. Opcionalmente, puede añadirse Hidróxido de Aluminio como un adyuvante adicional en una proporción de 10 a 25 veces la cantidad de Proteoliposoma. El valor de pH final se mantiene a $7,0 \pm 0,4$. La adsorción del complejo proteoliposoma-polisacárido en gel de Alumbre es mayor del 80 % y se garantiza un contenido de LPS por debajo del 6 %. El LPS se incorpora en el proteoliposoma, lo cual permite una presentación adecuada al sistema inmune, reduciéndose la posibilidad de reacciones tóxicas indeseadas. Puede añadirse tiomersal como conservante a una concentración final del 0,005-0,02 %. El producto final se somete a varios ensayos de control de calidad biológicos y físico-químicos.

Ejemplo 3. Determinación de la alergenicidad (actividad de unión a IgE) de la formulación adsorbida en el Hidróxido de Aluminio.

La actividad alérgica, expresada como la capacidad de unión de anticuerpos IgE humanos, se determinó por medio de ELISA de inhibición de IgE. Este ensayo determina la capacidad de la solución de muestra para inhibir la unión de IgE a un alérgeno aplicado como un recubrimiento en una fase sólida. En este caso, la formulación de muestra es el alérgeno purificado de *D. siboney* de acuerdo con el Ejemplo 1, mezclado con proteoliposomas obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 2 y adsorbidos en gel de Hidróxido de Aluminio. La concentración inicial de alérgeno Der s 1 es 4 µg/ml y la actividad alérgica: 400 UB/ml (UB: Unidades Biológicas de acuerdo con la definición de Nordic Guidelines for the Registration of Allergenic Products, 2ª Edición. 10 000 UB/ml son equivalentes a 10 mg/ml de Histamina HCl en el Ensayo de Pinchazo en la Piel).

El ELISA se realiza de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se recubren microplacas de poliestireno con el Extracto de Alérgeno de Referencia. Los sitios de unión no específica se bloquean con PBS-BSA al 1 %. Después, se realiza la inhibición de las reservas de IgE del suero incubando el suero con cantidades crecientes de la muestra de alérgeno y la Referencia, en paralelo. La IgE no inhibida se captura por el alérgeno aplicado como un revestimiento sobre la placa. Después de retirar por lavado los anticuerpos unidos no específicamente, se realiza la detección de la IgE, unida al alérgeno, añadiendo AcM anti-IgE marcado con peroxidasa. Después de añadir un sustrato cromogénico adecuado, se mide la intensidad del color del producto de reacción usando un lector de placas ELISA. Para el análisis e interpretación de los resultados se usa el procedimiento estadístico de líneas paralelas. Se construyen curvas de inhibición de referencia y de muestra y se realiza un análisis de regresión lineal verificando el paralelismo entre cada línea de muestra y la línea de Referencia. Finalmente, se calcula la potencia relativa como logaritmo inverso de la distancia horizontal entre las líneas paralelas.

En el análisis de la muestra proporcionada, se obtuvieron los siguientes resultados:

Actividad alérgica: 21,2 UB/ml (CI95 % 13,6 - 32,4). Este valor representa únicamente el 5,3 % de la actividad inicial del alérgeno en solución acuosa.

Ejemplo 4. Determinación del esquema y dosificación que muestran menos inducción de IgE total.

Para la determinación del esquema de inmunización (tiempo entre dosis) y la concentración del alérgeno, a ratones Balb/c se les administraron por vía intramuscular dos inmunizaciones en las semanas: 0 y 2 (esquema corto) o 0 y 4 (esquema largo) con Alérgeno (Al) + Alumbre (A) a concentraciones de 1 ó 5 µg por ratón de Der s 1. En el esquema corto se extrajo sangre de los animales en las semanas 0, 2 y 5 y, en el esquema largo, en las semanas 0, 4 y 7. El nivel total de IgE en reservas de suero se determinó por ELISA.

Como puede observarse en la Figura 1, el esquema corto induce una respuesta de IgE significativamente más pequeña que esquema largo. Por otro lado, la concentración de alérgeno inferior (1 µg) no pudo inducir IgE en todos los esquemas. Por esta razón, los siguientes experimentos se realizaron usando el esquema corto y una dosis de alérgeno de aproximadamente 1 µg/ratón.

Para determinar de manera más precisa la dosis, a ratones Balb/c se les administraron de nuevo por vía intramuscular dos inmunizaciones en las semanas 0 y 2 y se extrajo sangre en las semanas 0 y 4. El Grupo I recibió proteoliposoma + polisacárido de *N. meningitidis* del serogrupo C + Al(OH)₃. Los Grupos II, III y IV recibieron Al(OH)₃ + alérgeno a las siguientes dosis: 0,5; 1,25 ó 2,5 µg/ratón, respectivamente. El nivel de IgE total en las reservas de suero se determinó por ELISA. Como puede observarse en la Figura 2, la IgE no mostró ningún aumento significativo en ninguno de los grupos evaluados.

Ejemplo 5. Ausencia de efecto de la incorporación de alérgeno sobre la respuesta específica de proteoliposoma y modulación de la respuesta de la subclase de IgG específica de alérgeno.

Para la determinación del efecto del alérgeno sobre la respuesta hacia los antígenos del proteoliposoma, a ratones Balb/c se les administraron por vía intramuscular dos inmunizaciones las semanas 0 y 2. El Grupo I recibió proteoliposoma + polisacárido C + Al(OH)₃ (adyuvante de vacuna "va"). Los Grupos II, III y IV recibieron 0,5; 1,25 y 2,5 µg/ratón de Alérgeno + adyuvante de vacuna "va", respectivamente. La extracción de sangre se realizó los días 0, 15 y 35 después de la primera inmunización. Las respuestas de la subclase de IgG específica de alérgeno y proteoliposoma se determinaron por ELISA.

Como puede observarse en la Figura 3, se detectaron altos títulos de IgG anti-proteoliposoma y, sorprendentemente, no se observó ningún efecto debido a la incorporación del alérgeno. Tampoco se detectó ningún defecto en la respuesta de subclase de IgG (Figura 4). Los altos títulos de IgG2a son una expresión de una respuesta Th1 preferente, inducida por este adyuvante. La Figura 5 muestra la estimulación de diferentes subclases de IgG específicas de alérgeno. Puede observarse el aumento de los niveles de IgG2a a menores concentraciones de alérgeno, y particularmente a 1,25 y 0,5 µg. La inducción de la respuesta de IgG2a al alérgeno refleja que el adyuvante podía modular la respuesta Th2 hacia Th1.

Ejemplo 6. Producción de IFN- γ y no IL-5 por esplenocitos de ratones inmunizados después de la exposición *in vitro* al proteoliposoma o al alérgeno. Correlación de la producción de citocinas con la respuesta de subclase de IgG específica de alérgeno. Comparación entre la formulación de adyuvante: proteoliposoma + polisacárido C + Al(OH)₃ y Al(OH)₃ solo.

Para la determinación de la respuesta de citocinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-5), se inmunizó a ratones Balb/c con dos dosis en las semanas 0 y 2. El Grupo I recibió proteoliposoma + polisacárido C + Al(OH)₃ (adyuvante de vacuna "va"). Los Grupos II, III y IV recibieron 0,5; 1,25 y 2,5 μ g/ratón de Alérgeno + adyuvante de vacuna "va", respectivamente. El Grupo V recibió una dosis inicial de adyuvante de vacuna "va" y una segunda dosis de 0,5 μ g de Alérgeno + adyuvante de vacuna "va". Los animales se sacrificaron 7 días después de la última dosis. Se retiró el bazo y se procesó mediante técnicas rutinarias y las células se cultivaron en presencia de proteoliposoma o alérgeno. Después de 72 horas, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se procesaron por ELISA para la determinación de IFN- γ e IL-5.

La exposición al proteoliposoma del cultivo celular indujo la producción de IFN- γ en todos los grupos, lo que corresponde al patrón Th1 conocido inducido por este adyuvante. Sin embargo, en los grupos inmunizados con una dosis de alérgeno de 0,5 μ g, la producción de IFN- γ se reforzó de manera sorprendente, cuando se administraron dos inyecciones de alérgeno (Grupo II) o cuando se usó una dosis previa de Va y una sola inyección de alérgeno (Grupo V, Figura 6). Sorprendentemente, la exposición al alérgeno también indujo una respuesta de IFN- γ en todos los grupos. Inesperadamente, esta respuesta fue superior en grupos inmunizados con 0,5 μ g de alérgeno para las dos variantes: dos inyecciones de alérgeno o solamente una inyección de alérgeno con una administración previa de adyuvante de vacuna "va" (Figura 7). No se detectó respuesta de IL-5 después de la exposición al proteoliposoma o al alérgeno. Estos resultados reflejan la modulación por el adyuvante del patrón Th2 inducido por alérgeno, hacia un patrón Th1.

Para determinar los anticuerpos de subclase de IgG e IgG específica de alérgeno, se realizó otro experimento similar. Se inmunizó a los ratones siguiendo el mismo diseño descrito anteriormente, pero usando solamente alérgeno adsorbido en Al(OH)₃. La extracción de sangre se realizó 0, 15 y 35 días después de la primera inmunización. La respuesta de IgG en suero se evaluó por ELISA. La respuesta de IgG específica de alérgeno fue significativamente superior cuando se usó el adyuvante de vacuna "va", en comparación con Al(OH)₃. Sorprendentemente, las diferencias entre los dos adyuvantes fueron superiores con las dosis del alérgeno inferiores: 0,5 y 1,25 μ g. Sin embargo, se consiguió la mayor respuesta de IgG específica de alérgeno con la mayor dosis de alérgeno para los dos adyuvantes (Figura 8). La subclase de IgG predominante fue IgG1 para todos los adyuvantes y combinaciones. Sin embargo, la subclase IgG2 se indujo con todas las composiciones que contenían el adyuvante de vacuna "va", mientras que solamente se obtuvieron valores ligeramente positivos con Al(OH)₃ a las dos dosis de alérgenos superiores (2,5 y 1,25 μ g). Por otro lado, sorprendentemente, la mayor diferencia con respecto a la respuesta de IgG2a entre los dos adyuvantes se observó con la menor dosis de alérgeno (0,5 μ g). En este caso, se observó que los valores eran negativos para Al(OH)₃ y positivos para el adyuvante de vacuna "va" (Figura 9).

Ejemplo 7. Determinación de la inducción y funcionalidad de IgE específica de alérgeno.

Para la determinación de la respuesta de IgE específica de alérgeno, se inmunizó a ratones Balb/c con dos dosis en las semanas 0 y 2. El Grupo I recibió Al(OH)₃. El Grupo II recibió proteoliposoma + polisacárido C + Al(OH)₃ (adyuvante de vacuna "va"). Los Grupos II y IV recibieron 1 y 5 μ g de alérgeno + Al(OH)₃, respectivamente. Los Grupos V y VI recibieron 0,5; 1,25 y 2,5 μ g de alérgeno + adyuvante de vacuna "va". Se extrajo sangre de los animales los días 0, 15 y 35 después de la primera inmunización. La respuesta de IgE se evaluó en ratas Wistar macho por el procedimiento de Anafilaxis Cutánea Pasiva (ACP) mediante una evaluación cualitativa y semicuantitativa. Las variables de respuesta se expresaron en términos de tiempo y dilución de suero que dio un resultado positivo y en unidades arbitrarias de densidad de mancha. Se extrajo suero los días 0 (T₀), en el momento de la segunda dosis (T15) y 14 días después de la segunda dosis (T35). Como puede observarse en la Tabla 1 (Intensidad de las manchas de reacción en ACP y última dilución de suero positiva), las últimas diluciones positivas para los grupos V a VII (cuando se usó la composición de vacuna) son inferiores a las de los grupos III y IV (Alumbre). Lo mismo ocurre con las densidades ópticas. Esto indica una importante reducción en la respuesta de IgE específica de alérgeno. No se observó respuesta en los controles negativos (I y II).

En los grupos de control negativo (I y II), los valores de respuesta fueron negativos. En el grupo III se observó un valor positivo a los 35 días, con una intensidad de 10660, que fue detectable hasta una dilución 1:16. El Grupo IV resultó positivo comenzando a partir de la primera dosis (15 días) con una intensidad de 9345, detectable hasta una dilución 1:8. A los 35 días se observó una potente respuesta con una intensidad de 39843, detectable hasta una dilución 1:32. Por el contrario, sorprendentemente, en los grupos que recibieron adyuvante de vacuna "va", la respuesta de IgE específica de alérgeno fue muy baja, solamente se observó a los 35 días, mostrando bajas intensidades y fue detectable solamente a bajas diluciones. Puede indicarse que con la dosis de alérgeno inferior (0,5 μ g), solamente se detectó una respuesta minoritaria usando suero no diluido (1:1), que desapareció cuando el suero se diluyó 1:2 (Figura 10 y Tabla 1). Estos resultados muestran una menor inducción de IgE con el adyuvante de vacuna "va" en comparación con Al(OH)₃, y usando las dosis de alérgeno inferiores, coinciden con los resultados de los ejemplos previos, en los que se observó que la IgE total era menor y el IFN- γ e IgG2a superiores.

Tabla 1

Grupo	Inmunización	Positividad, días después de la 2ª dosis	Densidad de mancha (unidades arbitrarias)	Última dilución positiva
I	Al	-	0	-
II	P+PC+Al(Va)	-	0	-
III	1 µg A + Al	35	10660	1:16
IV	5 µg A + Al	15 * 35	9345-39843	1:8 1:32
V	0,5 µg A + Va	35	1245	1:1
VI	1,25 µg A + Va	35	4054	1:4
VII	2,5 µg A + Va	35	4574	1:8

Leyenda: Al, Al(OH)₃; P, Proteoliposoma; PC, Polisacárido C del serogrupo C de *N. meningitidis*; A, Alérgeno y (*) días después de la primera dosis; Va, Adyuvante de vacunas "va" (P-PC+Al).

Ejemplo Nº 8. Acoplamiento covalente del alérgeno al Proteoliposoma

El acoplamiento covalente por conjugación química puede realizarse por algunos de los procedimientos conocidos, por ejemplo, los procedimientos descritos en la Patente de Estados Unidos 4.695.694 y en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos SN 362.179; 555.558; 555.974; 555.966 y 555.339. Los procedimientos preferidos son reactivos homobifuncionales como Glutaraldehído o Anhídrido Succínico, que acoplan las dos moléculas a través de los grupos amino libres. Estos grupos amino libres pueden encontrarse en proteínas de alérgenos y en el proteoliposoma, particularmente en restos de lisina. Además, se usan reactivos heterobifuncionales, preferentemente Ésteres de N-Hidroxisuccinimida-Maleimida (tales como MBS, MPS, SMPB, GMBS, EMCS). En este caso, primero se realiza la reacción, mediante el acoplamiento del agente de entrecruzamiento a grupos amino disponibles en el proteoliposoma, seguido del acoplamiento del grupo maleimida del agente de entrecruzamiento a los grupos sulfhidrilo libres en la molécula de alérgeno. A continuación se presentan un ejemplo de conjugación de alérgeno purificado de *Dermatophagoides siboney* al proteoliposoma, usando el procedimiento Glutaraldehído, y un ejemplo de la respuesta inducida después de la inmunización de ratones con el conjugado.

Conjugación: se añadió proteína de alérgeno purificada de acuerdo con el Ejemplo 1 a una solución de 200 µg/ml de proteoliposoma en PBS, pH 7,0, a una concentración de alérgeno final de 20 µg/ml. Se añadió un volumen de Glutaraldehído al 0,4 % y se agitó durante 1 hora. La reacción se detuvo añadiendo glicina a 25 mol/l (concentración final); después, el pH se ajustó a 7,0 - 7,8. El Glutaraldehído no unido se retiró por filtración en gel en una columna Sephadex G25. Para purificar adicionalmente el conjugado, para retirar el alérgeno libre restante, el producto se pasó a través de una columna cromatográfica Sephacryl S-300 con la adición previa de detergente Desoxicolato Sódico hasta una concentración final del 1 %. Se recogió el primer pico, que correspondía al volumen de exclusión de la matriz. Después se retiró el detergente mediante diálisis contra PBS. El producto obtenido se concentró 10 veces por Ultrafiltración en membrana (Amicon, USA) con un valor límite de 10 000 KDa. El contenido de Der s 1 en el conjugado se midió mediante ELISA tipo sándwich usando anticuerpos monoclonales específicos de alérgeno. La concentración se ajustó por dilución con PBS a un valor apropiado para el procedimiento de adsorción: 10 µg/ml. Finalmente, el producto se esterilizó por filtración en membrana de 0,2 µm.

Procedimiento de adsorción: se mezclaron volúmenes iguales de Hidróxido de Aluminio a 1,2 mg/ml y solución de alérgeno conjugado a 10 µg/ml en PBS, pH 7,0. La mezcla se agitó suavemente a 200 rpm durante 30 minutos. La adsorción de la proteína en el gel de Aluminio se comprobó supervisando la adsorbancia del sobrenadante a 280 nm, dando un valor superior al 90 %.

Inmunización: se inmunizaron tres grupos de ratones Balb/C (de 7 ratones cada uno) con dos dosis de alérgeno en solución PBS ("Ds") o conjugado de alérgeno-proteoliposoma en PBS ("PLS-Ds"), o conjugado de Alérgeno-proteoliposoma en Hidróxido de Aluminio ("PLS-DsAlum"), respectivamente. La concentración del alérgeno Der s 1 fue 5 µg/ml para todas las variantes. Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal las semanas 0 y 4. Se extrajo sangre de los ratones al comienzo del experimento (0) y en las semanas 4 y 8.

Resultados: los niveles de IgG total e IgG específica de alérgeno, así como los anticuerpos de suero de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b se determinaron por ELISA. Además, se determinó la respuesta de IgE específica de alérgeno usando el procedimiento de Anafilaxis Cutánea Pasiva (ACP) en ratas Wistar macho. Los resultados en

relación con la respuesta de anticuerpos se muestran en la Figura 11. Puede observarse que, en general, las variantes que contienen el conjugado inducen una respuesta de IgG significativamente mayor que la del alérgeno solo. Esto también es válido para todas las subclases de IgG: IgG1, IgG2a e IgG2b. Sin embargo, la respuesta de IgE total fue inferior para la variante que contenía el conjugado en solución PBS (es decir, sin Hidróxido de Aluminio). Además, los resultados de ACP mostraron que esta variante no inducía ninguna respuesta específica de alérgeno detectable (superior al Control Negativo), mientras que tanto el alérgeno libre como el conjugado adsorbido en gel de Aluminio inducían respuestas detectables a diluciones 1:1 y 1:10, respectivamente.

Ejemplo Nº 9. Formulación con varios alérgenos.

La formulación de diferentes alérgenos en una composición de vacuna puede realizarse por acoplamiento no covalente (por mezcla y adsorción en el gel de Hidróxido de Aluminio) o por acoplamiento covalente, de acuerdo con el Ejemplo 8. En este caso, cada alérgeno se conjuga por separado con el proteoliposoma, y finalmente se formulan juntos. En el presente ejemplo se expone una preparación de una formulación no covalente de tres alérgenos de diferentes especies de ácaros, comunes en regiones tropicales (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* y *Blomia tropicalis*).

Los alérgenos de dichos ácaros se preparan por separado de acuerdo con el Ejemplo 1. En el caso de *Blomia* se usa el extracto de alérgeno liofilizado completo, sin fraccionamiento. El contenido de alérgenos principales Der p 1, Der s 1 y Blo t 5 se determina usando ELISA-AcM. La actividad alergénica total se determina mediante ELISA de inhibición de IgE de acuerdo con el Ejemplo 3. Los alérgenos liofilizados se resuspendieron en PBS, pH 7,0, a una concentración de 20 µg/ml (para Der p 1 y Der s 1) o 10 µg/ml (para Blo t 5) y se esterizaron por filtración en membrana de 0,2 µm, dando una actividad alergénica de 4000 UB/ml. El proteoliposoma se añadió a cada alérgeno por separado a una concentración final de 200 µg/ml. Las soluciones se homogeneizaron durante 30 minutos con agitación suave a 150 rpm. Después, se añadieron volúmenes iguales de Hidróxido de Aluminio a 2 mg/ml en PBS, pH 7,0, a cada solución de alérgeno y se mezclaron con agitación suave durante 60 min a 150 rpm. La adsorción de proteínas en el gel de aluminio se comprobó supervisando la adsorbancia del sobrenadante a 280 nm. Finalmente, se mezclaron los tres productos de alérgenos individuales con agitación suave durante 10 minutos. Se demostró que los alérgenos y el proteoliposoma se adsorbían casi completamente en el gel ensayando en el sobrenadante en suspensión el contenido de Der p 1, Der s1 y Blo t 5 mediante ELISA (INDOOR Biotech, Reino Unido) y mediante el procedimiento de Lowry para la determinación del contenido de proteínas. La actividad alergénica residual (no adsorbida) se determinó de acuerdo con el Ejemplo 3. Se obtuvo más de un 90 % de adsorción de alérgeno y una reducción de actividad alergénica menor del 20 %.

Se administraron dos dosis de 0,5 ml de la formulación (contenido de alérgeno total: 3,33 µg de Der s y Der p 1, 1,17 µg de Blo t 5) a ratones Balb/c con un intervalo de tres semanas por la vía intraperitoneal. Los anticuerpos IgG específicos de alérgeno se determinaron por ELISA después de 7 semanas desde el comienzo del esquema de inmunización. Se observó una respuesta de anticuerpos equilibrada para todos los alérgenos, en una proporción de aproximadamente 2:2:1, contra *D. pteronyssinus*, *D. siboney* y *Blomia tropicalis*, respectivamente. Los niveles de IgG observados fueron, como promedio, un 80 % superiores a los valores obtenidos para la inmunización con la mezcla de alérgeno en PBS.

Breve descripción de las Figuras:

Figura 1: la Figura 1 muestra que el esquema corto (0-14 días) induce una IgE total menor que el esquema largo (0-28 días). Extracción de sangre los días 0, 15 y 35 después de la inmunización en el esquema corto y en los días 0, 28 y 35 en el esquema largo. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; Al, Al(OH)₃. Dosis de alérgeno: 1 y 5 µg/ratón. Como puede observarse, en el grupo inmunizado con 5 µg, la respuesta de IgE es superior usando el esquema largo que usando el esquema corto, después de la segunda inyección. De hecho, la respuesta secundaria en el grupo con concentración idéntica con el esquema corto tuvo una tendencia a disminuir.

Figura 2: se observa cómo la concentración de alérgeno produce menos inducción de IgE total. Extracción de sangre los días 0, 15 y 35 después de la inmunización. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; Al, Al(OH)₃; dosis de alérgeno: 0,5; 1,25 y 2,5 µg/ratón. Como puede observarse, la inducción de IgE total por la dosis de 0,5 µg de alérgeno es similar al control con adyuvante (Va). Las otras dos concentraciones de alérgeno (1,25 y 2,5) aumentan el nivel total de IgE.

Figura 3: muestra cómo la inclusión del alérgeno no afecta a la respuesta de IgG específica de proteoliposoma. Extracción de sangre los días 0, 15 y 35 después de la inmunización. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; dosis de alérgeno: 0,5; 1,25 y 2,5 µg/ratón. Puede observarse que la inclusión del alérgeno en una composición de vacuna no afecta a la respuesta de IgG a los antígenos del proteoliposoma, ni después de la primera ni después de la segunda dosis en comparación con la administración de la mezcla de adyuvante sin alérgeno (Va).

Figura 4: se observa que la inclusión del alérgeno no influye en la respuesta de subclase IgG específica de proteoliposoma. Extracción de sangre los días 0, 15 y 35 después de la inmunización. Va, Proteoliposoma +

Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; dosis de alérgeno: 0,5; 1,25 y 2,5 µg/ratón. La inmunización con la composición de vacuna que incluye el alérgeno, mantiene sin cambios el patrón de subclase de IgG específica de proteoliposoma en comparación con la mezcla de adyuvante sola (Va).

5 **Figura 5:** muestra cómo se indujeron anticuerpos IgG2a específicos de alérgeno por bajas concentraciones de alérgeno. Extracciones de sangre los días 0, 15 y 35 después de la inmunización. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; dosis de alérgeno: 0,5; 1,25 y 2,5 µg/ratón. Las dos concentraciones de alérgeno inferiores (0,5 y 1,25) indujeron una respuesta IgG2a.

10 **Figura 6:** se refiere a la determinación de la producción de IFN-γ inducida por proteoliposoma. Se extrajeron células esplénicas 7 días después de la segunda inmunización (semana 2). Va: Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; dosis de alérgeno: 0,5; 1,25 y 2,5 µg/ratón. 1Va+Va-A0,5: inyección inicial con Va y una segunda dosis con Va + 0,5 µg de alérgeno. La concentración de alérgeno inferior aumenta la producción de IFN-γ inducida por proteoliposoma.

15 **Figura 7:** se refiere a la determinación del IFN-γ inducido por alérgeno y sin influencia de una dosis previa de adyuvante. Se extrajeron células esplénicas 7 días después de la segunda inmunización (semana 2). Va: Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; dosis de alérgeno: 0,5; 1,25 y 2,5 µg/ratón. 1Va+Va-A0,5: inyección inicial con Va y una segunda dosis con Va + 0,5 µg de alérgeno. Se observó producción de IFN-γ inducida por alérgeno para todas las concentraciones de alérgeno, pero fue superior al valor de menor concentración. Una inyección previa de la mezcla de adyuvante no afecta a esta respuesta.

20 **Figure 8:** se observa que la dosis de alérgeno inferior induce mayores diferencias de respuesta de IgG específica de alérgeno entre la composición de vacuna y el Hidróxido de Alumbre. Se extrajo suero 14 días después de la segunda dosis. Se administraron inyecciones los días 0 y 27. Va: Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; Al: Al(OH)₃; dosis de alérgeno: 0,5; 1,25 y 2,5 µg/ratón. Puede observarse que, las menores dosis (0,5 y 1,25) indujeron mayores aumentos en la respuesta de IgG específica de alérgeno, que la dosis mayor.

25 **Figura 9:** se refiere a la inducción de IgG2a específica de alérgeno. Se extrajo suero 14 días después de la segunda dosis. Se administraron inyecciones los días 0 y 27. Va: Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; Al: Al(OH)₃; dosis de alérgeno: 0,5; 1,25 y 2,5 µg/ratón. Puede observarse que todas las variantes que contenían Va indujeron una respuesta de IgG2a específica de alérgeno significativa en comparación con las variantes que contenían solamente alérgeno adsorbido en alumbre.

30 **Figura 10:** muestra la reducción de la IgE específica de alérgeno por la composición de vacuna (Grupo V a VII) en comparación con controles positivos (Grupos III y IV), medida por anafilaxis cutánea pasiva. Va: Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃; A, alérgeno; Al: Al(OH)₃. Se extrajo suero los días (To), en el momento de la segunda dosis (T15) y 14 días después de la segunda dosis (T35). La respuesta en los grupos (V-VII) es menor que en los grupos inmunizados con alérgeno adsorbido en alumbre (III y IV). No se observó respuesta en los controles negativos (I y II).

35 **Leyenda:** -, ausente; +, presente; A, Alérgeno, Va, Proteoliposoma + Polisacárido C de *N. meningitidis* + Hidróxido de Aluminio; Al, Hidróxido de Aluminio.

40 **Figura 11:** se refiere a la respuesta de anticuerpos específicos de alérgeno a conjugados alérgeno-proteoliposoma. Se inmunizaron ratones con dos dosis de 5 µg de Der s 1, en diferentes variantes: Ds (alérgeno libre); Ds-PLS (conjugado a Proteoliposoma); [Ds-PLS]Alum (Conjugado adsorbido en Hidróxido de Aluminio). La respuesta se evaluó a las 8 semanas después de la primera inmunización. Las barras verticales indican la desviación típica.

45

REIVINDICACIONES

1. Composición de vacuna para enfermedades alérgicas que comprende:
 - a) proteoliposomas derivados de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*;
 - b) uno o varios alérgenos de naturaleza peptídica o glicopeptídica derivados de ácaros domésticos y
 - c) Hidróxido de Aluminio como adyuvante.
2. Composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho proteoliposoma deriva de *Neisseria meningitidis* serogrupo B.
3. Composición de vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicha composición contiene entre 20 y 75 µg de proteoliposoma por dosis.
4. Composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho alérgeno deriva de ácaros domésticos del género *Dermatophagoides*.
5. Composición de vacuna de la reivindicación 4, en la que dicho alérgeno deriva de ácaros domésticos de la especie *Dermatophagoides siboney*.
6. Composición de vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en la que los alérgenos principales son alérgenos del Grupo 1 (Der s 1, Der p 1, Der f 1) y alérgenos del Grupo 2 (Der s 2, Der p 2, Der f 2).
7. Composición de vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en la que el alérgeno está en la proporción de 0,1 a 1 por 10 unidades de masa de proteoliposoma, y entre 0,25 y 7,5 µg por dosis.
8. Composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que un resto lipófilo está acoplado covalentemente al alérgeno y en la que dicho resto lipófilo es un ácido graso bipolar con 16 a 20 carbonos.
9. Composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho adyuvante se añade en una proporción de 10 a 25 por unidad de masa de proteoliposoma y su contenido final está entre 250 y 1000 µg por dosis.
10. Composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende adicionalmente un polisacárido derivado de la especie *N. meningitidis* serogrupo C.
11. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicho polisacárido se añade en una proporción de 0,5 a 4 por unidad de masa de proteoliposoma.
12. Procedimiento para obtener la composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dichos alérgenos de ácaros se preparan y purifican de acuerdo con el siguiente procedimiento:
 - a) liofilización o concentración por ultrafiltración del extracto alérgénico hasta una concentración de proteína de 10 a 100 mg/ml;
 - b) precipitación en solución de sulfato amónico al 50-100 % y selección del sedimento;
 - c) fraccionamiento por medio de cromatografía de tamizado molecular usando una de las siguientes matrices: Sephacryl S-100, Sephacryl S-200, Sephacryl S-300 o Superdex 75, y selección de la fracción que corresponda a los pesos moleculares de 10-60 kDa;
 - d) liofilización y concentración por ultrafiltración hasta una concentración de proteína entre 10 y 100 µg/ml;
 - e) acoplamiento del alérgeno al proteoliposoma en una relación de 0,1 a 1 por 10 unidades de masa del proteoliposoma;
 - f) agitación a 60-600 rpm durante 30 a 90 minutos.
 - g) adición de Hidróxido de Aluminio en una proporción de 2 a 6 por unidad de masa de proteoliposoma;
 - h) homogeneización de la mezcla con agitación a 60-600 rpm durante 30 a 90 minutos.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el acoplamiento del alérgeno al proteoliposoma, de acuerdo con la etapa (e), es covalente o no covalente.
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 ó 8, en el que dicho procedimiento comprende adicionalmente las siguientes etapas:
 - a) adición de polisacárido en una proporción de 0,5 a 4 por unidad de masa de proteoliposoma
 - b) homogenización por agitación a 60-600 rpm durante 30 a 90 minutos.

Figura 1

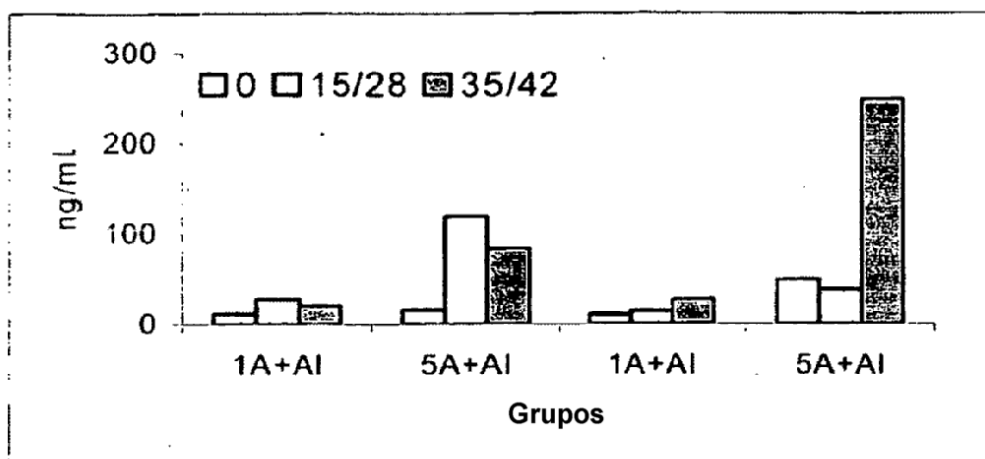


Figura 2

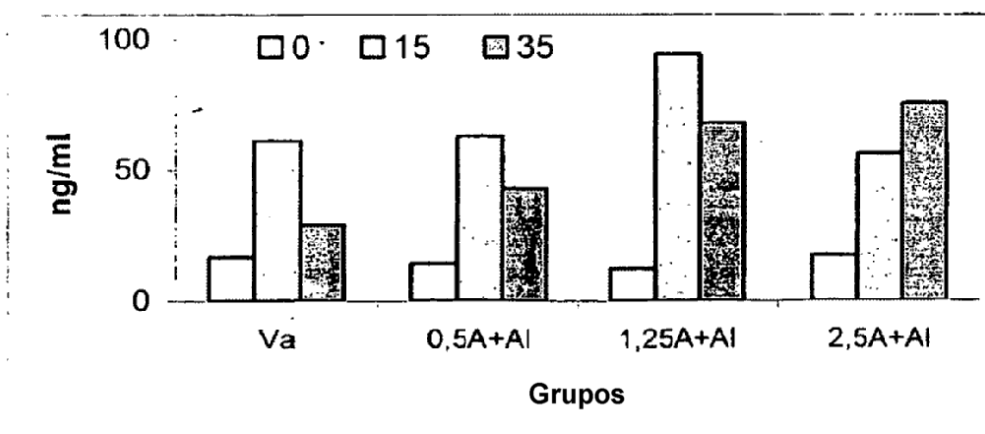


Figura 3

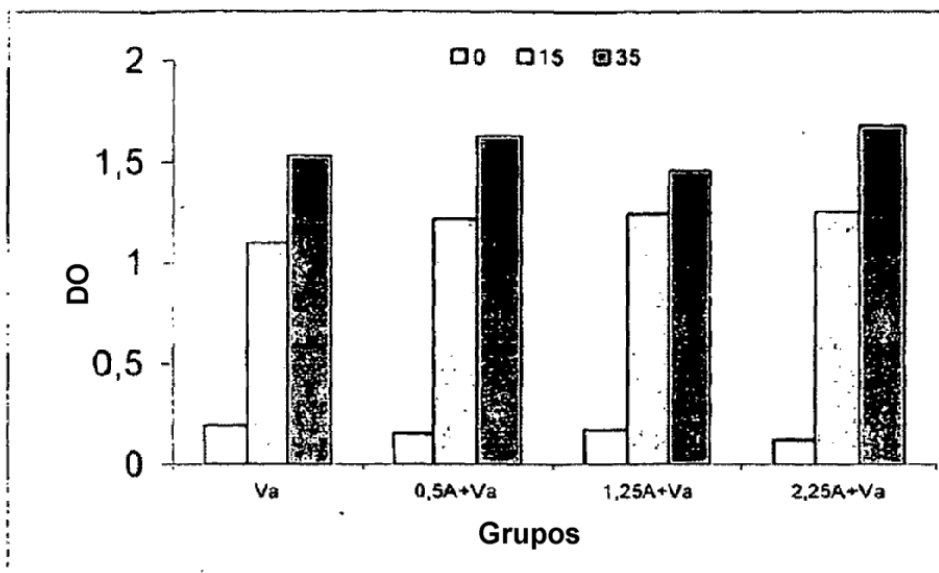


Figura 4

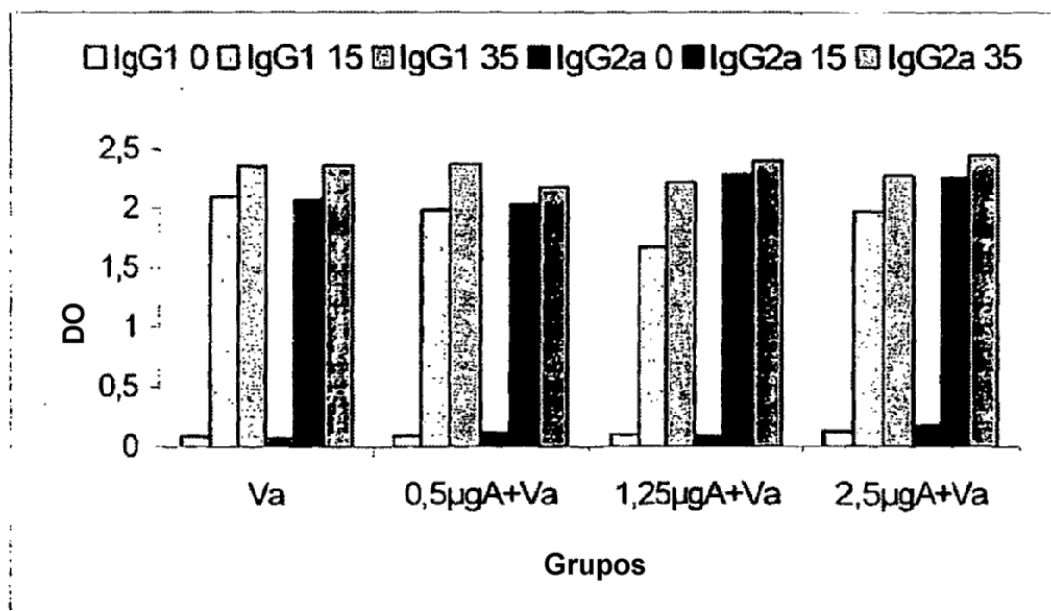


Figura 5A.

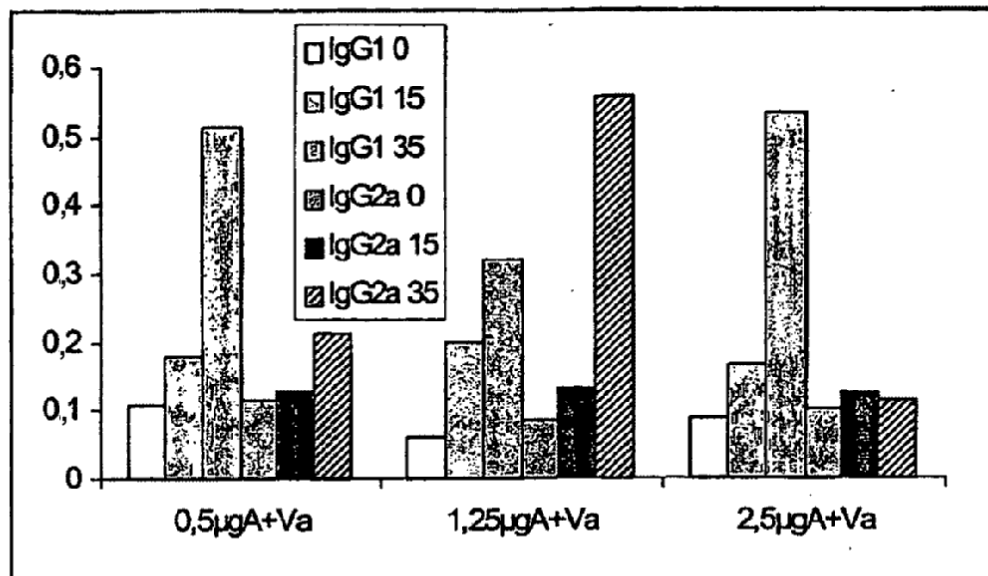


Figura 5B.

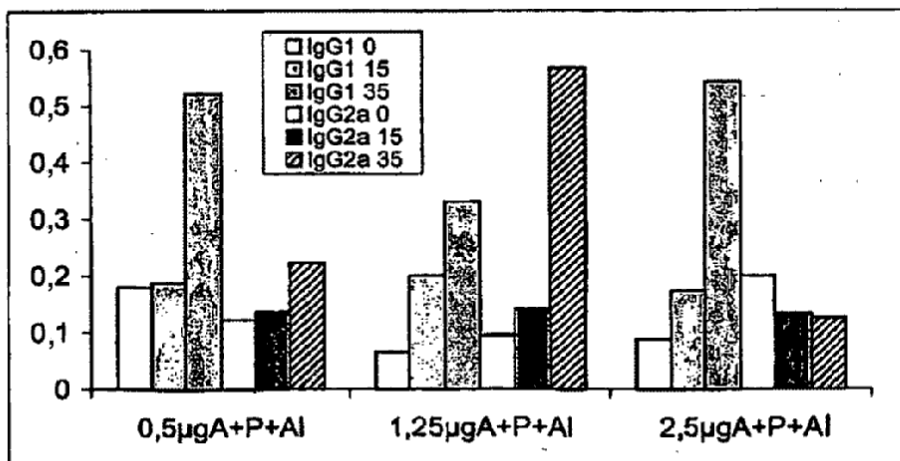


Figura 6

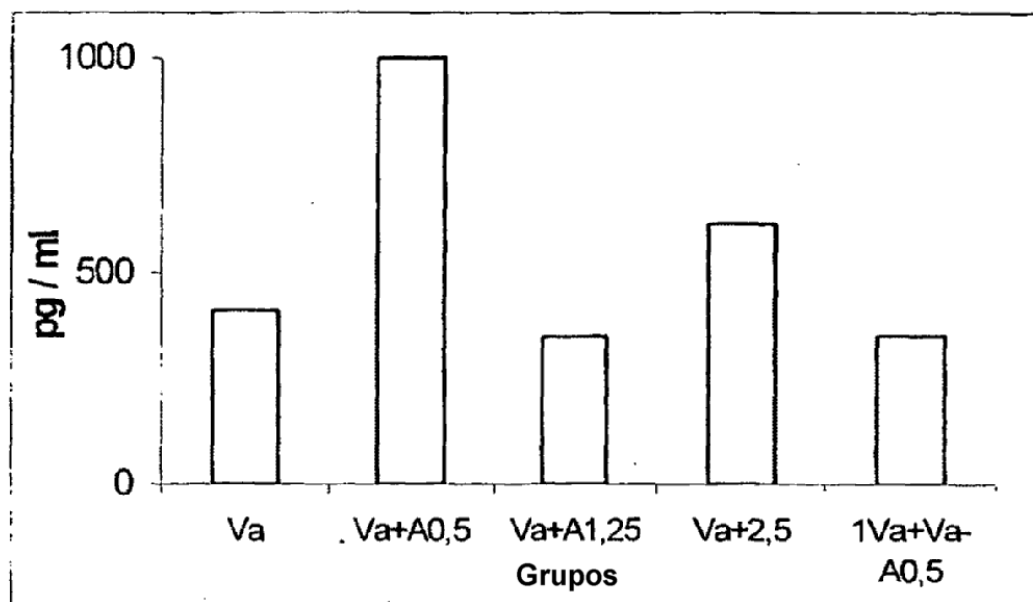


Figura 7A

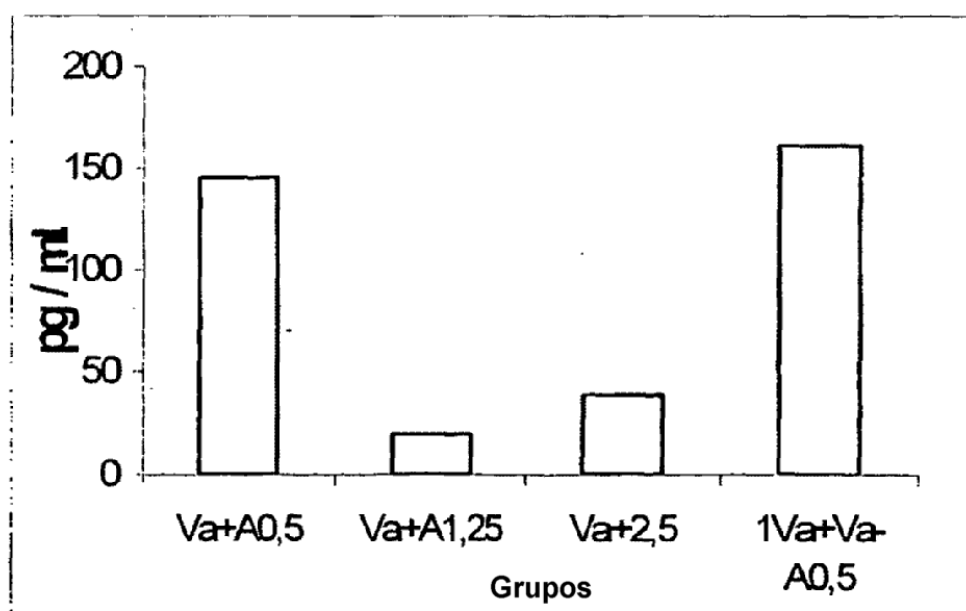


Figura 7B

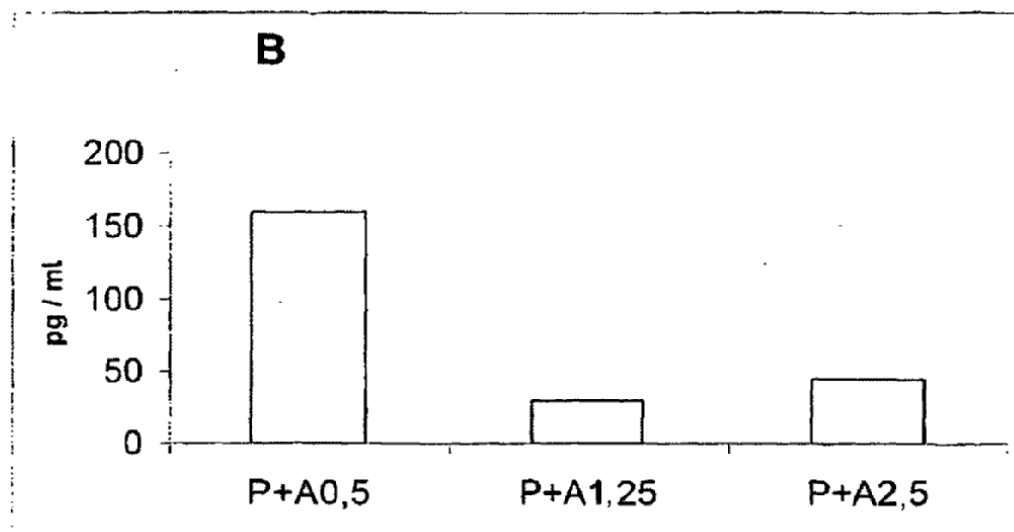


Figura 8

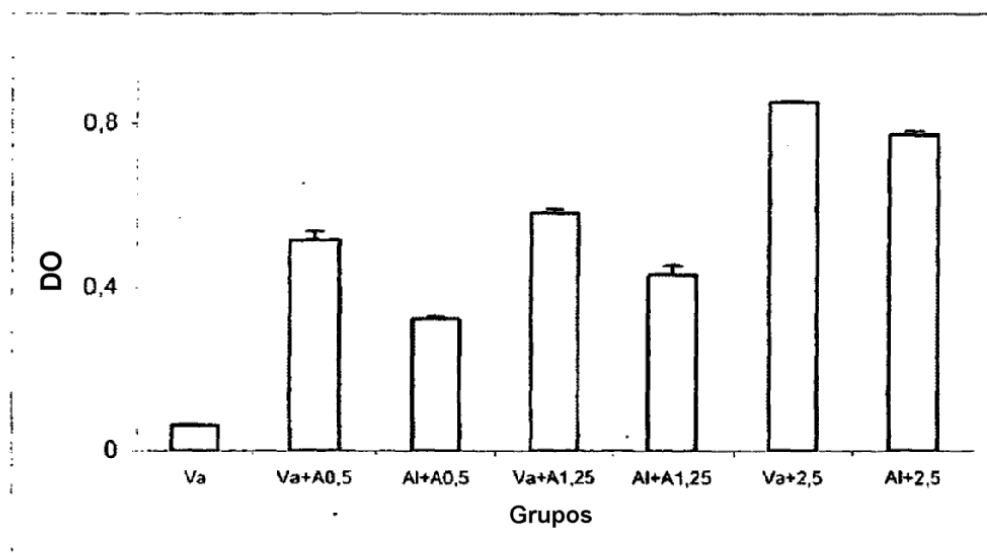


Figura 9

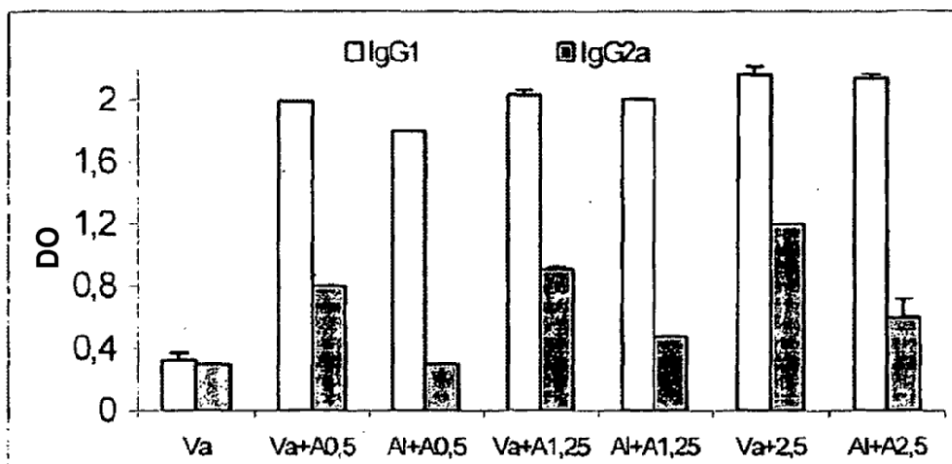


Figura 10

