

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 680**

51 Int. Cl.:
A61K 39/35 (2006.01)
A61K 39/36 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09748476 .0**
96 Fecha de presentación: **02.10.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2320946**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2011**

54 Título: **Alergoides derivados de alérgenos**

30 Prioridad:
01.09.2008 IT MI20081565

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.07.2012

73 Titular/es:
Lofarma S.p.A.
Viale Cassala, 40
20143 Milano, IT

72 Inventor/es:
MISTRELLO, Giovanni;
RONCAROLO, Daniela;
ZANONI, Dario;
ZANOTTA, Stefania y
FALAGIANI, Paolo

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 384 680 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Alergoides derivados de alérgenos

5 La presente invención se refiere a la preparación de alergoides derivados de alérgenos por funcionalización química, con el fin de reducir el riesgo de inducir efectos secundarios cuando se usan como vacunas antialérgicas en la inmunoterapia de las enfermedades alérgicas.

10 Las enfermedades alérgicas son causadas por una anomalía del sistema inmunitario y son causadas por la producción de anticuerpos particulares de la clase IgE, específicos contra sustancias ubicuas (denominadas con el término alérgenos), completamente inocuos por sí mismos, como la mayoría de los pólenes, ácaros, los derivados epiteliales, el veneno de himenópteros, esporas fúngicas, y diferentes alimentos. Dichos anticuerpos IgE son capaces de unirse a un receptor específico que está presente en la membrana, por ejemplo en la membrana de los mastocitos de la mucosa, o de los basófilos, y reaccionando posteriormente con los alérgenos a los que están dirigidos son capaces de inducir la liberación de mediadores (entre ellos, histamina) por las células mencionadas antes, cuyos mediadores finalmente son los verdaderos promotores de la reacción alérgica. Los síntomas alérgicos van desde rinitis-conjuntivitis a urticaria, asma, hasta el choque anafiláctico, siendo este último un suceso que puede ser letal.

20 Estimaciones recientes indican que más de 20 % de la población que vive en países industrializados padece este tipo de enfermedad que, si persiste en el tiempo y si no se trata de forma adecuada, puede determinar un empeoramiento de los síntomas (por ejemplo, aparición de asma después de una rinitis) y de la sensibilización que se puede extender también a otros alérgenos que afectan todavía más a la calidad de vida de aquellos sujetos que la padecen, y hace más compleja la identificación del remedio terapéutico más adecuado para usar en el tratamiento de la misma.

30 La terapia de hiposensibilización específica (ITS), a diferencia de la terapia farmacológica, que se limita a intervenir en los síntomas que luego reaparecen en el momento en el que el efecto del fármaco cesa, es la única forma de tratamiento etiológico de las enfermedades alérgicas capaz de incidir positivamente en las causas que determinan la llamada "marcha alérgica" por la activación de algunos mecanismos inmunológicos que son la base del beneficio clínico inducido por la ITS (*Clin. Exp. Allergy*. 2008; 38: 1074-88. Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy. James LK, Durham SR.; *Allergy*. 2006; 61 Suppl 81: 11-4. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. Akdis CA, Barlan IB, Bahceciler N, Akdis M.).

35 La ITS consiste en la administración de dosis crecientes de extractos normalizados (vacunas), obtenidos partiendo de la misma sustancia que causa la enfermedad.

40 De esta forma, se induce progresivamente una especie de "tolerancia inmunológica" en el paciente frente a dicha sustancia, que es mediada por anticuerpos IgG específicos del alérgeno, también denominados "anticuerpos bloqueantes", que previniendo por un fenómeno de competición que los anticuerpos IgE reaccionen con el alérgeno al que están dirigidos, inhiben el desencadenamiento de la reacción alérgica y por consiguiente inhiben la aparición de los síntomas.

45 Las vacunas usadas para la ITS están compuestas de una mezcla bastante compleja de proteínas, es decir, glicoproteínas, componentes contra los que se dirigen los anticuerpos IgE específicos que produce un sujeto alérgico.

50 Aunque se ha demostrado la eficacia terapéutica de la ITS en una serie de estudios clínicos, no carece de riesgos relacionados con reacciones indeseadas también graves (*Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008; 30: 153-61. Local and systemic reactions occurring during immunotherapy: an epidemiological evaluation and a prospective safety-monitoring study. Ventura MT, Giuliano G, Buquicchio R, Accettura F, Carbonara M.; *Immunol. Allergy Clin. North Am*. 2007;27: 295-307, Anaphylactic reactions during immunotherapy. Rezvani M, Bernstein DI; *Allergy*. 2008; 63: 374. Anaphylactic shock because of sublingual immunotherapy overdose during third year of maintenance dose. Blazowski L.), que se pueden producir después de la administración de la vacuna. Dichas reacciones pueden ir desde reacciones locales limitadas (habones, eritema, picor, etc.) hasta reacciones sistémicas (agravamiento de los síntomas, asma, hasta choque anafiláctico); aunque dicho riesgo se ha reducido considerablemente mediante el uso de vacunas de liberación lenta (vacunas retardadas) o vacunas administradas por vías alternativas a la inyección, en cualquier caso limita el uso de la ITS en la terapia de enfermedades alérgicas, aplicada actualmente a un porcentaje pequeño comparado con todos los pacientes alérgicos identificados después de un examen de diagnóstico adecuado.

65 Las alergias alimentarias también están aumentando mucho. Recientemente, al contrario de lo que se ha reivindicado hasta hace unos pocos años, en los que la única terapia contra estas formas de alergia parecía estar representada por la eliminación del alimento sospechoso de la dieta, cada vez está más establecida la idea en el campo de la alergología, de que la opción de un procedimiento de ITS específico también es adecuado para las formas de alergia alimentaria. Sin embargo, está claro que el uso de alérgenos naturales para la terapia de las

formas de alergia alimentaria tendría los mismos límites (riesgo de efectos indeseados) encontrados en la ITS de las formas de alergia respiratoria. De hecho, dichos riesgos pueden incluso exacerbarse, puesto que estas formas de alergia a menudo implican sujetos de edades de pocos meses o pocos años.

- 5 En años recientes, se ha centrado la atención en el desarrollo de vacunas que son más eficaces y con un grado de seguridad mayor. En particular, la identificación de procedimientos de modificación química que son más o menos selectivos, dirigidos a reducir el potencial alergénico de las vacunas conservando su potencial inmunógeno todo lo que sea posible, referido a la capacidad para inducir la formación de anticuerpos IgG capaces de reconocer también, cuando se administran al sujeto, los componentes no modificados (naturales), que son aquellos a los que está expuesto el sujeto alérgico, y determinar el desarrollo de los síntomas específicos, conduce al desarrollo de los llamados alergoides (*J. Allergy Clin. Immunol.* 1985;76: 397-401. Modified forms of allergen immunotherapy. Grammer LC, Shaughnessy MA, Patterson R.; *Int. Arc. hAllergy Appl. Immunol.* 1971; 41: 199-215. Preparation and properties of, allergoids, derived from native pollen allergens by mild formalin treatment. Marsh DG).
- 10
- 15 El desarrollo de alérgenos también de origen alimentario en forma de alergoides, y su uso en la inmunoterapia de alergias alimentarias específicas puede realmente ser crucial para proporcionar al sujeto alérgico algún tipo de tolerancia inmunológica, evitando así en el sujeto la aparición de esas reacciones que podrían ser potencialmente mortales después de la ingestión inconsciente de cantidades solo mínimas del alérgeno al que es sensible.
- 20 El grado de reducción del potencial alergénico de un extracto inducido por modificación química puede ser diferente de acuerdo con el tipo de reactivo que se usa para la modificación y/o el tipo de extracto. Usando cianato potásico como un reactivo "modificador", se obtienen los derivados llamados carbamilados, que se caracterizan por una alergenicidad reducida y una inmunogenicidad conservada (*Allergy.* 1996; 51: 8-15. Monomeric chemically modified allergens: immunologic and physicochemical characterization. Mistrello G, Brenna. O, Roncarolo D, Zanoni D, Gentili M, Falagiani P.).
- 25

Sin embargo, debe notarse que, puesto que los extractos sometidos a modificación química con cianato potásico son mezclas de proteínas muy heterogéneas, el grado de modificación determinado por la dosificación del grupo amino está estrictamente relacionado con el tipo de proteína que está presente, y por lo tanto, el dato que se obtiene expresa un valor medio del grado de modificación. De hecho, puede ocurrir que algunas proteínas alergénicas no sufran significativamente el efecto de la modificación con cianato potásico, y por lo tanto conserven la mayor parte de su actividad alergénica. A nivel del extracto modificado, la conservación opcional de la actividad alergénica por un componente del extracto no puede mostrarse. Sin embargo, durante muchos años se han desarrollado diferentes técnicas para la purificación de los alérgenos individuales. Por lo tanto, extendiendo el procedimiento de modificación química al nivel de componentes individuales, ahora se puede indicar el grado de sustitución que se puede obtener con el cianato potásico. Por ejemplo, en el caso del alérgeno Der p1, uno de los principales alérgenos del ácaro de la especie *Dermatophagoides pteronyssinus*, que está presente en el polvo de la casa, el grado de modificación determinado por la reacción con el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) no supera el 50 %, comparado con un grado de modificación del extracto de aproximadamente 80 %.

30

35

40

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación para la inmunoterapia específica (ITS) que se proporcione con una mayor tolerabilidad, y que en particular minimice además el riesgo de posibles efectos secundarios indeseados mostrados por los alergoides de la técnica anterior, sin disminuir así el efecto de desensibilización que es intrínseco de la terapia alergénica convencional.

45

Dicho objetivo se logra mediante alergoides en los que la actividad alergénica residual que queda después de la modificación con cianato potásico u otro reactivo por carbamilación o tiocarbamilación se reduce más gracias a un segundo procedimiento de modificación química, proporcionada mediante el uso de un dialdehído o dicetona tal como fenilglioxal u otros reactivos similares (glioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, parahidroxifenilglioxal, etc.). Mientras que el cianato potásico, u otro reactivo de carbamilación o tiocarbamilación, reaccionan específicamente con los grupos ε-amino de los restos de lisina, el fenilglioxal tiene como su objetivo específico el grupo guanidina de los restos arginina de las proteínas (Blazer AN. Specific chemical modification of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1970; 39: 101-30). El grado de modificación de los restos de arginina se ha determinado, por lo tanto, como describen Shah y colaboradores. (Shah MA, Tayyab S y Ali R. Probing Structure-activity relationship in diamine oxidase reactivities of lysine and arginine residues. *Int. Journal of Biol. Macromolecules:* 18; 77-81, 1996).

50

55

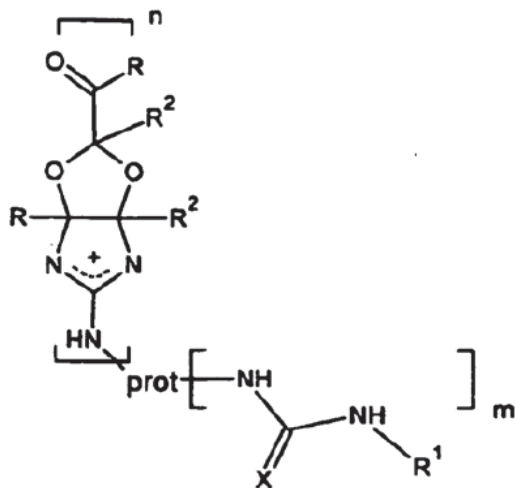
Se ha indicado que la modificación química de los extractos alergénicos o proteínas individuales, llevada a cabo por reacción con fenilglioxal solo, induce una reducción pobre de su actividad alergénica. Igualmente, la inversión de la secuencia de modificación, fenilglioxal y posteriormente cianato potásico no da resultados prometedores en la reducción del potencial alergénico. El documento DE-A-2039223 describe la preparación de alergoides modificados con cianato potásico o compuestos dicarbonílicos, cuya alergenicidad es aproximadamente 10 % del alérgeno no modificado. No se ha sugerido combinación de estas modificaciones.

60

Por lo tanto, el objeto específico de la presente invención se representa por los alérgenos modificados que tienen una alergenicidad reducida comparado con el correspondiente material alergénico natural y caracterizado porque todos o parte de los grupos amina primaria de los restos de lisina y arginina de las moléculas alergénicas están

65

funcionalizados como se muestra en la estructura (I), adoptando dichos alérgenos después de modificación respectivamente con (i) reacción de carbamilación o tiocarbamilación, y (ii) reacción con un dialdehído o dicetona, la siguiente estructura (I):



(I)

5

en la que:

10 R y R² se seleccionan independientemente de H, alquilo C1-C5, fenilo, opcionalmente sustituido en orto, meta o para con un grupo hidroxilo, alcoxi C1-C4, halógeno, amino, alquilamino, dialquilamino, mercapto, alquilmercapto C1-C4;

X representa O, S o NR₃, en el que R₃ es H, alquilo con 1-6 átomos de carbono, fenilo o CN;

15 R₁ representa H, alquilo con 1-8 átomos de carbono, fenilo o arilalquilo con hasta 8 átomos de carbono, o alquilo que contiene un anillo heterocíclico;

prot representa el resto de proteína del alérgeno;

20 n es el número de grupos arginina funcionalizados, y está en el intervalo entre 1 y el número de grupos arginina presentes en el alérgeno;

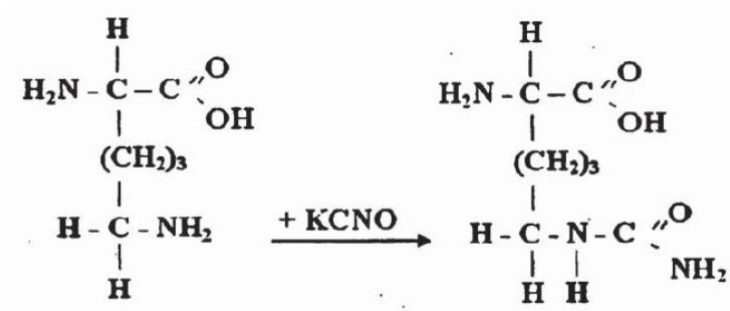
m es el número de grupos lisina funcionalizados y está en el intervalo entre 1 y el número de grupos lisina presentes en el alérgeno.

25 Grupos alérgenos modificados preferidos de fórmula (I) son aquellos en los que R es fenilo, opcionalmente sustituido en en orto, meta o para con un grupo hidroxilo, alcoxi C1-C4, halógeno, amino, alquilamino, dialquilamino, mercapto, alquilmercapto C1-C4, y R₂ es hidrógeno.

30 Otros alérgenos modificados preferidos son aquellos en los que X es O o S, y R₁ es hidrógeno y preferiblemente R y R₂ son como se han definido en el párrafo anterior.

Alérgenos modificados particularmente preferidos son aquellos en los que R es fenilo, R₁ y R₂ son hidrógeno, y X es O o S.

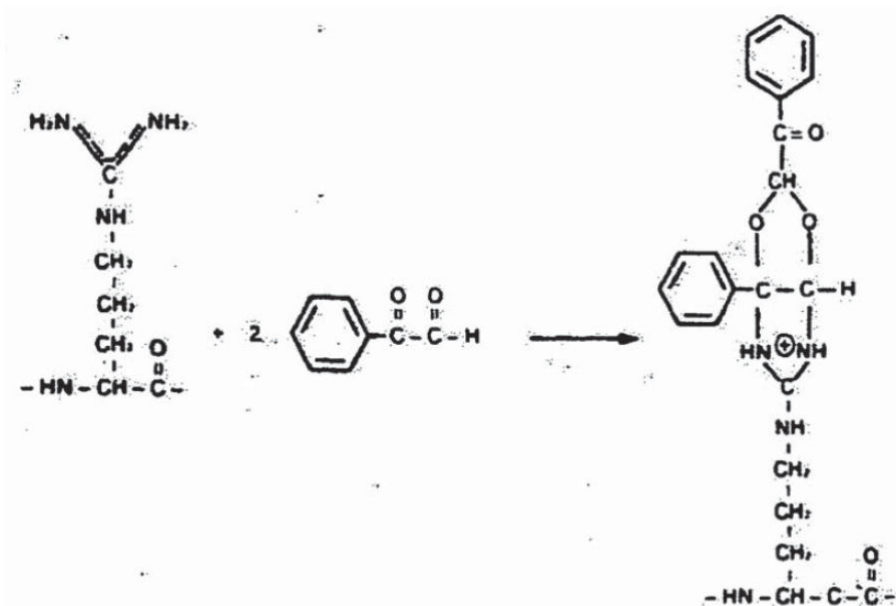
35 A modo de ejemplo, el esquema 1 representa la reacción de la lisina con cianato potásico:



Esquema 1

El siguiente esquema 2 representa un ejemplo de la reacción de funcionalización con fenilglicoxal de un resto de arginina del alergoide:

5



Esquema 2

10 El material alergénico que se va a someter al método de acuerdo con la invención se puede obtener de diferentes fuentes tales como ácaros, pólenes, epitelio de animales, micofitos, proteínas de origen alimentario (leche, huevos, cereales, melocotón, manzana, etc.) por extracción de las proteínas alergénicas con un disolvente adecuado, típicamente acuoso; dicho material también puede estar compuesto de proteínas purificadas de las materias primas citadas antes, o en forma recombinante, producidos por técnicas convencionales de biología molecular.

15 La funcionalización por una reacción de carbamilación o tiocarbamilación se produce por el tratamiento con cianato alcalino (KCNO o NaCNO), o isocianatos o tiocianatos orgánicos.

20 Los derivados en los que X es NR₃ se pueden obtener partiendo de los compuestos en los que X es S por reacción de guanidilación con un compuesto de fórmula R₃-NH₂, de acuerdo con los procedimientos que son convencionales y conocidos para el experto en la material, tal como por ejemplo, el uso del reactivo de Mukaijama.

25 Para la modificación de un extracto con cianato potásico (KCNO), es adecuado que la concentración final de la sal esté en el intervalo entre 0,1 M y 1,5 M, preferiblemente entre 0,4 M y 0,8 M, opcionalmente manteniendo el pH entre 7 y 11, preferiblemente entre 9 y 9,6; la temperatura puede estar en el intervalo entre temperatura ambiente y 50 °C, preferiblemente entre 35 y 40 °C, durante un tiempo de reacción total entre 12 y 36 horas, preferiblemente entre 16 y 24 horas. En el caso de modificación con isocianatos o isotiocianatos orgánicos, que son sustancias más reactivas, la reacción debe realizarse a temperatura ambiente o por debajo, preferiblemente entre 0 °C y 5 °C, mientras que el tiempo de reacción podrá estar en el intervalo entre 30 min y 8 h, preferiblemente entre 2 y 4 h. Debido a la poca solubilidad en agua, la reacción se podrá llevar a cabo en presencia de un disolvente orgánico compatible.

30

Al final de la reacción, el extracto así modificado se somete a filtración en gel para separar el exceso de reactivo y se equilibra con una disolución salina adecuada.

- 5 El grado de sustitución de los grupos -NH₂ de las lisinas que están presentes en las moléculas alergénicas que componen el extracto, o las moléculas alergénicas individuales purificadas o en una forma recombinante después de modificación con cianato potásico, se puede determinar por un ensayo con ácido trinitrobenzenosulfónico (Habeeb, Anal. Bioch. 14, 328, 1966), o analizando la desaparición de los restos de lisina y la aparición de homocitrulina, con métodos o análisis instrumentales adecuados que son conocidos para los expertos en la materia.
- 10 Para la modificación con fenilgloxal (PGO), a las muestras modificadas con KCNO en las condiciones descritas antes, se les añade una cantidad de bicarbonato sódico 0,1 M, para llevar así el pH de las disoluciones a 8,0. La concentración de proteínas de las muestras está en el intervalo entre 1 y 10 mg/ml (extractos) o 0,1 y 2,5 mg/ml (proteínas purificadas) determinado de acuerdo con Lowry (*J. Biol. Chem.*, 1970: 193, 265-275. Protein measurement With Folin Phenol reagent. Lowry, Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.). Posteriormente, se añade
- 15 PGO a las disoluciones mencionadas antes, para así tener un exceso molar del mismo en el intervalo entre 100 y 1600, preferiblemente entre 400 y 800. Con el fin de facilitar la disolución del PGO, este último se ha disuelto previamente en alcohol etílico a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml. La mezcla se deja con agitación suave durante un periodo de tiempo en el intervalo entre 30 min y 8 h, preferiblemente 4 h, a temperaturas en el intervalo entre 20 y 37 °C, preferiblemente 25 °C. Después, la reacción prosigue con la diálisis o la filtración en gel
- 20 contra un tampón adecuado del extracto así obtenido. Se sigue el mismo procedimiento usando los otros reactivos modificadores de los restos de arginina.

Se usará un método similar para la funcionalización con diferentes dialdehídos o dicetonas.

- 25 El grado de sustitución de los restos arginina se evalúa de acuerdo con Shah. Basándose en el método mencionado anteriormente, el grado de sustitución de los grupos arginina se determina considerando un coeficiente de extinción molar de 11000 M⁻¹cm⁻¹, a 250 nm para el complejo de difenil-arginina, cuya formación es la consecuencia de la reacción con PGO.
- 30 En general, el porcentaje medio de grupos amina primaria modificados estará en el intervalo entre 75 % y 100 %, típicamente de aproximadamente 90 %; mientras que el porcentaje medio de los restos de arginina sustituidos estará en el intervalo entre 25 y 100 %, típicamente de aproximadamente 40 %.

Breve descripción de las figuras

- 35 La figura 1 muestra la evaluación de la actividad alergénica del extracto de PD, natural y después de modificación con KCNO o KCNO/fenilgloxal;
- 40 la figura 2 muestra la reactividad de la IgG en el suero de ratones inmunizados con extracto de DP modificado con KCNO/fenilgloxal;
- la figura 3 muestra el perfil de proteínas del extracto de DP natural, modificado con KCNO o KCNO/fenilgloxal;
- 45 la figura 4 muestra la evaluación de la actividad alergénica de Der p1 natural y después de modificación con KCNO o KCNO/fenilgloxal;
- la figura 5 muestra la reactividad de la IgG en el suero de ratones inmunizados con Der p1 modificado con KCNO/fenilgloxal;
- 50 la figura 6 muestra el perfil del alérgeno Der p1 natural, modificado con KCNO o KCNO/fenilgloxal;
- la figura 7 muestra la evaluación de la actividad alergénica de la ovoalbúmina natural y después de modificación con KCNO o KCNO/fenilgloxal;
- 55 la figura 8 muestra la reactividad de la IgG en el suero de ratones inmunizados con ovoalbúmina modificada con KCNO/fenilgloxal;
- la figura 9 muestra el perfil de la ovoalbúmina natural, modificada con KCNO o KCNO/fenilgloxal;
- 60 la figura 10 muestra la evaluación de la actividad alergénica de Pru p3 recombinante, natural y después de modificación con KCNO o KCNO/fenilgloxal;
- la figura 11 muestra la reactividad de la IgG en el suero de ratones inmunizados con Pru p3 recombinante modificado con KCNO/fenilgloxal;
- 65 la figura 12 muestra el perfil del alérgeno Pru p3 recombinante natural o después de modificación con KCNO o

KCNO/fenilgloxal.

Sección experimental

- 5 De acuerdo con los métodos descritos antes, se preparan muestras de alergoides obtenidas después de reacción con KCNO, o que tienen la doble sustitución KCNO/PGO.

Posteriormente, las muestras “doblemente” modificadas se comparan con las modificadas con KCNO, o naturales, en términos de potencial alergénico por inhibición de EAST, dimensiones moleculares por SDS-PAGE y actividad inmunogénica por ELISA.

La presente invención ahora se describirá con más detalle mediante ejemplos no limitantes, relativos al procedimiento de modificación con KCNO/PGO de algunos alérgenos tanto en forma de extractos como en forma de proteínas individuales purificadas del propio extracto, o comerciales, o producidas de forma recombinante por técnicas de biología molecular. Como ejemplo del extracto alergénico para uso terapéutico, se ha seleccionado el extracto de ácaros DP, puesto que en virtud de su ubicuidad, pueden ser la causa de alergia específica en todo el mundo. En este sentido, el extracto de DP se puede considerar como representativo de esta clase. Sin embargo, el procedimiento de modificación química se ha extendido también a proteínas purificadas individuales tales como el alérgeno conocido como Der p1 (uno de los alérgenos principales del extracto de DP obtenido por un procedimiento de purificación adecuado del mismo extracto), cuya actividad alergénica se conserva en gran medida también después de modificación con KCNO, y a proteínas purificadas de origen alimentario, una causa también de alergias específicas que desgraciadamente pueden resultar letales para el sujeto afectado.

Por lo tanto, los autores de la invención también han tenido en cuenta dos alérgenos de origen alimentario para sus experimentos: ovoalbúmina (OVA), una proteína comercial purificada de la albúmina de huevo, siendo esta última con frecuencia la causa de una alergia específica en niños; el alérgeno conocido como LTP (proteína de transferencia de lípidos, Pru p3), que es el alérgeno principal del extracto de melocotón (pero está presente en muchos otros alimentos vegetales), y también es responsable de reacciones alérgicas incluso graves. Este último alérgeno se ha obtenido en una forma recombinante por la aplicación de técnicas de biología molecular. Cada ejemplo viene con los ensayos experimentales relacionados.

EJEMPLO 1

Procedimiento de modificación química de un extracto de ácaros del género *Dermatophagoides pteronissinus*, con KCNO, o una combinación de KCNO/PGO secuencial

El extracto de ácaros del género *Dermatophagoides pteronissinus* (Greer Labs, Lenoir, NC, EE.UU.) se ha preparado, después de la extracción de grasa con éter dietílico, combinando 100 ml de PBS (tampón de fosfato 0,015 M, NaCl 0,135 M, a pH 7,2) que contiene azida al 0,05 % (PBS-A) con 5 g de cuerpos de ácaros deshidratados, y después sometiendo la mezcla a un tratamiento con ultrasonidos durante 1 min (Branson Ultrasonics, Sonifier 450, Danbury CT, EE.UU.) con el fin de romper el exoesqueleto y promover la extracción de las proteínas alergénicas contenidas en estos. Al final, la preparación se puso con agitación a 4 °C durante la noche. Después de centrifugar a 1400 rpm durante 30 min y separar el sedimento insoluble, el líquido sobrenadante se dializó contra H₂O destilada y se liofilizó.

El extracto liofilizado después se recoge en un volumen de tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 6,86, para así alcanzar una concentración de proteínas de 2,5 mg/ml de acuerdo con Lowry. Posteriormente dicho extracto se filtró en gel en Sephadex™ G-25 (GE Healthcare Uppsala, Suecia), eluyendo con el mismo tampón y recogiendo el pico excluido. Esta operación se lleva a cabo para separar los compuestos de bajo peso molecular que podrían interferir en el sucesivo procedimiento de modificación química. A 50 ml de dicha disolución se añaden 1,92 g de tetraborato sódico decahidrato y 2,05 g de cianato potásico. Las sales se disolvieron por agitación lenta, y el pH opcionalmente se ajustó a 9,3 con NaOH 1 M. La disolución resultante se mantuvo con agitación lenta durante 16 h en un baño con termostato a 40 °C en un matraz herméticamente cerrado. Durante las primeras horas, se controló el pH y opcionalmente se ajustó por adición de ácido fosfórico 1 M. La preparación así obtenida se filtró en gel otra vez en una columna G-25 para separar el reactivo en exceso, y se esterilizó con membranas de 0,22 micrómetros Millipore. Una parte mínima de la misma se usó para los sucesivos análisis. El porcentaje de sustitución de los grupos amina del extracto, evaluado por el ensayo de TNBS, resultó ser igual a 76 %. El resto del extracto modificado con KCNO se sometió a un segundo procedimiento de modificación química con PGO en las condiciones experimentales descritas a continuación.

El extracto de DP modificado con KCNO, o el extracto de DP antes de la modificación con una concentración de proteínas de 2,0 mg/ml (Lowry), se lleva a pH 8 por adición de bicarbonato sódico 0,1 M. Posteriormente, a la muestra modificada con KCNO se añade PGO con un exceso molar de 800 con respecto a las proteínas. Con el fin de calcular el exceso molar, siendo un extracto y no una proteína individual, se han descargado todas las secuencias conocidas de los alérgenos del extracto de DP de la base de datos UniProKB. Considerando la masa molecular de cada alérgeno conocido, el número de restos de arginina en la base de la secuencia de aminoácidos

reivindicada y la cantidad relativa de los diferentes alérgenos basándose en la intensidad de las bandas visibles después de SDS-PAGE del extracto de DP, se ha establecido arbitrariamente considerar para el extracto de DP un peso molecular medio de 40 kDa y un número medio de restos de arginina de 15. Con el fin de facilitar la disolución del PGO, este último se ha disuelto previamente en alcohol etílico a una concentración 0,3 M. La mezcla se deja con agitación suave durante 4 h a 25 °C. Después, la reacción prosigue con la diálisis o la filtración en gel contra PBS 20 mM. El grado de sustitución de los restos de arginina en las muestras que se consideran resulta ser igual a 37 %. Posteriormente, cuando era posible, la muestra de DP modificada con KCNO/PGO se comparó con la modificada con KCNO o la natural, en términos de potencial alergénico por inhibición de EAST, capacidad inmunológica por ELISA y dimensiones moleculares por SDS-PAGE.

Evaluación de la alergenicidad por inhibición de EAST

Para este objetivo, se activaron con extracto de DP perlas de poliestireno previamente tratadas con glutaraldehído, en una proporción de 1 µg de proteína por perla.

Al mismo tiempo, se prepara una mezcla de sueros humanos, seleccionados de pacientes que son alérgicos al extracto de DP con registros clínicos de alergia a ácaros.

Se añaden a los pocillos de una placa ELISA 30 µl de diluciones seriadas en PBS-BSA al 2 % (diluyente) de las muestras que se están considerando (extracto de DP natural, extracto de DP modificado con KCNO, extracto de DP modificado con KCNO/PGO), llevados previamente a la misma concentración, y 20 µl de sueros mezclados; la mezcla se deja con agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se prepara una muestra de control positivo, en la que el inhibidor está compuesto de diluyente. Al final de las dos horas, se añade una perla activada con DP y 50 µl de PBS-BSA al 2 % a cada pocillo, y la placa se mantiene con agitación durante la noche a temperatura ambiente. Después las perlas se lavan y se añaden a cada pocillo 100 µl de una disolución de anticuerpo dirigido contra IgE humana conjugado con peroxidasa y se incuban con agitación durante 2 h. Después de 3 lavados, se obtiene el desarrollo de la reacción colorimétrica por adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y por incubación durante 15 minutos a 25 °C. La reacción se inactiva por la adición de 50 µl de HCl 1 M, y después se transfieren 100 µl de la mezcla de cada pocillo a una nueva placa, y se evalúa la intensidad del color desarrollado mediante lectura espectrofotométrica a 450 nm.

Las densidades ópticas detectadas se transforman en porcentajes de inhibición en relación con el control positivo y se hace una representación gráfica en la que el porcentaje de inhibición se da en el eje Y, y el logaritmo del volumen de muestra usado en el ensayo se da en el eje X. A partir de los puntos recogidos, se construye una recta de regresión lineal en la que se mide el valor de CI₅₀, que representa el volumen en microlitros de muestra que es necesario para una inhibición de 50 % de la unión de IgE a la perla. Dicho valor es inversamente proporcional al potencial alergénico de la muestra que se está considerando.

Los resultados, representados en la figura 1, muestran que la modificación con KCNO reduce la actividad alergénica 18 veces, mientras que la modificación combinada con KCNO/PGO tiene un efecto sinérgico, reduciendo la actividad alergénica del extracto de DP 227 veces. Es muy probable que dicha reducción adicional de la actividad alergénica del extracto de DP después de modificación con KCNO/PGO pueda deberse al efecto de la modificación doble en el alérgeno Der p1 (véase el ejemplo 2).

Evaluación de la inmunogenicidad del extracto de DP modificado con KCNO/PGO por ELISA del suero de ratones previamente inmunizados

a) Protocolo de inmunización de ratones

Se inmunizó un grupo de ratones compuesto de 4 hembras de la cepa Balb/c (Charles River) por vía subcutánea con 200 µl de una emulsión compuesta de 100 µl de adyuvante completo de Freund y 20 µg de extracto de DP modificado con KCNO/PGO en 100 µl de disolución fisiológica. Se llevaron a cabo otros 3 refuerzos en intervalos de 2 semanas sustituyendo el adyuvante completo por el incompleto. Siete días después de la última inmunización, se lleva a cabo una extracción de sangre de la cola de los ratones, y la muestra se comprueba por ELISA en relación a la respuesta de anticuerpos contra el inmunógeno, así como a la capacidad de reconocer la proteína natural.

b) Procedimiento de ensayo

El ensayo se lleva a cabo para verificar si el extracto de DP modificado con KCNO/PGO mantiene un potencial inmunogénico, referido a la capacidad para inducir en el ratón, cuando se le administra de acuerdo con el protocolo indicado a continuación, una respuesta de IgG dirigida contra el extracto de DP natural no modificado. Para este objetivo, cantidades iguales (25 µg) de extracto de DP, natural o modificado con KCNO/PGO, en tampón de carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6, se adsorben en los pocillos de placas de poliestireno para ensayos ELISA por incubación a 4 °C durante 16 h. Los pocillos después se lavan con disolución de lavado (tampón de fosfato 60 mM pH 6,5 que contiene Tween-20 al 0,05 %) y los sitios libres se saturan con disolución diluyente (suero de caballo al

25 %, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05 %, tiomersal al 0,01 % en tampón de fosfato 150 mM, pH 7,4). Se añaden a cada pocillo partes alícuotas iguales (100 µl) de diluciones seriadas de 10 veces de mezcla de sueros de ratón en tampón diluyente, y se incuban a 25 °C durante 2 h. Después de 3 lavados, se añade el suero de conejo dirigido contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa en una dilución de 1: 2000 en tampón diluyente, la mezcla se incubaba a 25 °C durante 1,5 h. Después de 3 lavados el desarrollo de la reacción colorimétrica se obtiene por adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y por incubación durante 15 min a 25 °C. La reacción se inactiva por adición de 100 µl de HCl 1 N y se evalúa por la lectura espectrofotométrica a 450 nm. Los resultados en la reactividad de IgG específica de los sueros mezclados de los ratones inmunizados con el extracto de DP modificado con KCNO/PGO, contra las proteínas tanto de los extractos usados para inmunizar como de los equivalentes no modificados (natural), se muestran en la figura 2. Como puede observarse, los anticuerpos IgG inducidos por el tratamiento con extracto de DP modificado con KCNO/PGO son capaces de reconocer también las proteínas DP naturales (aunque a un nivel menor que contra las proteínas modificadas), lo que muestra que los epítopos T análogos a los presentes en el extracto de DP natural son conservados en el extracto de DP modificado con KCNO/PGO. Por lo tanto, el extracto modificado con KCNO/PGO mantiene la capacidad de estimular de forma adecuada el sistema inmunitario, para así producir anticuerpos IgG específicos dirigidos también contra las proteínas del extracto de DP natural.

Esta observación, si se refiere a seres humanos, es importante puesto que significa que el extracto de DP modificado con KCNO/PGO, en vista de una reducción adicional de la actividad alérgica, permanece potencialmente capaz de inducir una respuesta de IgG también contra proteínas de DP naturales, y por lo tanto es potencialmente capaz de inducir un beneficio clínico, puesto que la producción de anticuerpos IgG específicos es un elemento importante en la expresión de la eficacia terapéutica de la ITS (*Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003;132: 13-24. Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy., Flicker S, Valenta R).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis se llevó a cabo usando geles de acrilamida de 4-12 % de gradiente, previamente empaquetados y usados de acuerdo con las indicaciones del fabricante (NuPAGE® Novex® mini gels, Invitrogen, Milan). Este sistema de electroforesis en lotes a pH neutro permite una resolución mejor de las bandas en el intervalo de pesos moleculares de interés para los autores de la invención.

Las muestras de extracto de DP, naturales o modificadas con KCNO o KCNO/PGO se evaluaron por la técnica mencionada antes, en condiciones reductoras (presencia de 2-mercaptoetanol al 5 %) mediante carga en el gel de la misma cantidad de muestra (20 µg). La separación se lleva a cabo conectando el aparato a la fuente de alimentación del microordenador de electroforesis a 400/1000 y aplicando una corriente constante de 180 mA durante aproximadamente 1 h. Al final, el gel se tiñe con Coomassie coloidal (kit de tinción de azul coloidal, Novex®, Invitrogen). Los resultados que se pueden observar en la figura 3 indican la presencia de múltiples bandas, tanto en la muestra de DP natural como en la modificada con KCNO o KCNO/PGO. Los perfiles de SDS-PAGE parecen sustancialmente similares, incluso aunque, en efecto, es difícil evaluar en una muestra tan compleja un posible aumento de las dimensiones moleculares inducidas por la reacción con KCNO/PGO. Sin embargo, en los ejemplos sucesivos, llevados a cabo en proteínas individuales, parece que la modificación con KCNO/PGO no implica aumentos significativos de las dimensiones moleculares de las proteínas que se están investigando.

EJEMPLO 2

Procedimiento de modificación química del alérgeno principal de Der p1 con KCNO, o con una combinación de KCNO/PGO

a) Etapa de purificación del alérgeno Der p1 del extracto de DP

El alérgeno Der p1 se purificó del extracto de DP por cromatografía de afinidad, usando un anticuerpo monoclonal específico (isotipo IgG1, producido en Lofarma, laboratories) unido covalentemente a una matriz adecuada, tal como CNBr = Sepharose (GE Helthcare, Milán), de acuerdo con el procedimiento sugerido por el fabricante. El alérgeno Der p1, soportado en una columna, se eluye de la misma usando un tampón de glicina 5 mM, etilenglicol al 50 %, pH 10,0. El alérgeno purificado se cuantificó mediante lectura espectrofotométrica a 280 nm, considerando su coeficiente de extinción molar (E_{280}) igual a 47330, por lo tanto un valor de absorbancia de 1,89 a una concentración de 1 mg/ml. Finalmente, el Der p1 se liofilizó en presencia de sacarosa al 1 %.

La muestra de Der p1 liofilizada se recogió en un volumen de tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 6,86, para alcanzar así una concentración de proteínas de 0,2 mg/ml. Para la modificación con KCNO, se añaden 50,25 mg de tetraborato sódico anhidro y 101,4 mg de cianato potásico a 2,5 ml de disolución de Der p1. Las sales se disolvieron por agitación lenta y el pH se ajustó opcionalmente a 9,3 con NaOH 1 M. La disolución resultante se mantuvo con agitación lenta durante 16 h en un baño con termostato a 40 °C en un matraz cerrado herméticamente. Durante las primeras horas, se controló el pH y se ajustó opcionalmente por adición de ácido fosfórico 1 M. La preparación así obtenida se filtró en gel otra vez en una columna G-25 para separar el exceso de reactivo, y se esterilizó con membranas de 0,22 micrómetros de Millipore. Una parte mínima de la misma se usó para los análisis sucesivos. El

porcentaje de sustitución de los grupos amina del extracto, evaluado por el ensayo de TNBS, resultó ser de 50 %. El resto de la muestra modificada por KCNO se sometió a un segundo procedimiento de modificación química con fenilgloxal, en las condiciones experimentales descritas a continuación.

5 La muestra de Der p1 modificada con KCNO con una concentración de proteínas de 0,14 mg/ml (Abs 280 nm) se lleva a pH 8 por adición de bicarbonato sódico 0,1 M. Posteriormente, se añade PGO a la misma con un exceso molar de 800 con respecto a la proteína. Con el fin de calcular el exceso molar, se consideró para el alérgeno Der p1 un tamaño molecular de 25 kD de acuerdo con la base de datos UniProtKB, de lo cual resultaron 15 restos de arginina. Con el fin de facilitar la disolución del PGO, este último se ha disuelto previamente en alcohol etílico a una
10 concentración 0,15 M. La mezcla se deja con agitación suave durante 4 h a 25 °C. Después, la reacción prosigue con la diálisis o la filtración en gel contra PBS 20 mM. El grado de sustitución de los restos de arginina resulta ser igual a 41 %. Posteriormente, cuando era posible, la muestra de Der p1 modificada con KCNO/PGO se comparó con la modificada con KCNO o con PGO o la natural, en términos de potencial alergénico por inhibición de EAST, capacidad inmunológica por ELISA y dimensiones moleculares por SDS-PAGE.

15 Evaluación de la alergenicidad por inhibición de EAST

Para este objetivo, se activaron con Der p1 perlas de poliestireno previamente tratadas con glutaraldehído, en una proporción de 1 µg de proteína por perla.

20 Al mismo tiempo, se prepara una mezcla de sueros humanos, seleccionados de pacientes que son alérgicos al extracto de DP con registros clínicos de alergia a ácaros.

25 Se añaden a los pocillos de una placa ELISA 30 µl de diluciones seriadas en PBS-BSA al 2 % (diluyente) de las muestras que se están considerando (Der p1 natural, Der p1 modificado con KCNO, Der p1 modificado con KCNO/PGO), llevados previamente a la misma concentración, y 20 µl de sueros mezclados; la mezcla se deja con agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se prepara una muestra de control positivo, en la que el inhibidor está compuesto de diluyente. Al final de las dos horas, se añade una perla activada con Der p1 y 50 µl de PBS-BSA al 2 % a cada pocillo, y la placa se mantiene con agitación durante la noche a temperatura ambiente.
30 Después las perlas se lavan y se añaden a cada pocillo 100 µl de una disolución de anticuerpo dirigido contra IgE humana conjugado con peroxidasa y se incuban con agitación durante 2 h. Después de 3 lavados, se obtiene el desarrollo de la reacción colorimétrica por adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y por incubación durante 15 minutos a 25 °C. La reacción se inactiva por la adición de 50 µl de HCl 1 N, y después se transfieren 100 µl de la mezcla de cada pocillo a una nueva placa, y se evalúa la intensidad del color desarrollado
35 mediante lectura espectrofotométrica a 450 nm.

Las densidades ópticas detectadas se transforman en porcentajes de inhibición en relación con el control positivo y se hace una representación gráfica en la que el porcentaje de inhibición se da en el eje Y, y el logaritmo del volumen de muestra usado en el ensayo se da en el eje X. A partir de los puntos recogidos, se construye una recta de regresión lineal en la que se mide el valor de CI50, que representa el volumen en microlitros de muestra que es necesario para una inhibición de 50 % de la unión de IgE a la perla. Dicho valor es inversamente proporcional al potencial alergénico de la muestra que se está considerando.

45 Los resultados, representados en la figura 4, muestran que la modificación con KCN reduce la actividad alergénica del Der p1 16 veces, mientras que la modificación con KCNO/PGO muestra un efecto sinérgico, reduciendo la actividad alergénica del mismo 303 veces.

Evaluación de la inmunogenicidad de Der p1 modificado con KCNO/PGO por ELISA del suero de ratones previamente inmunizados

50 a) *Protocolo de inmunización de ratones*

Se inmunizó un grupo de ratones compuesto de 4 hembras de la cepa Balb/c (Charles River) por vía subcutánea con 200 µl de una emulsión compuesta de 100 µl de adyuvante completo de Freund y 20 µg de Der p1 modificado con
55 KCNO/PGO en 100 µl de disolución fisiológica. Se llevaron a cabo otros 3 refuerzos en intervalos de 2 semanas sustituyendo el adyuvante completo por el incompleto. Siete días después de la última inmunización, se lleva a cabo una extracción de sangre, y se comprueba por ELISA la respuesta de anticuerpos IgG específicos contra el inmunógeno, así como a la capacidad de reconocer la proteína natural.

60 b) *Procedimiento de ensayo*

El ensayo se lleva a cabo para verificar si Der p1 modificado con KCNO/PGO mantiene un potencial inmunogénico, referido a la capacidad para inducir en el ratón, cuando se le administra de acuerdo con el protocolo indicado a continuación, una respuesta de IgG dirigida contra el extracto de Der p1 natural no modificado. Para este objetivo,
65 cantidades iguales (0,1 µg) de Der p1, natural o modificado con KCNO/PGO, en tampón de carbonato/bicarbonato

50 mM pH 9,6, se adsorben en los pocillos de placas de poliestireno para ensayos ELISA por incubación a 4 °C durante 16 h. Los pocillos después se lavan con disolución de lavado (tampón de fosfato 60 mM pH 6,5 que contiene Tween-20 al 0,05 %) y los sitios libres se saturan con disolución diluyente (suero de caballo al 25 %, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05 %, tiomersal al 0,01 % en tampón de fosfato 150 mM, pH 7,4). Se añaden a cada pocillo partes
 5 alícuotas iguales (100 µl) de diluciones seriadas de 10 veces de mezcla de sueros de ratón en tampón diluyente, y se incuban a 25 °C durante 2 h. Después de 3 lavados, se añade el suero de conejo dirigido contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa en una dilución de 1: 2000 en tampón diluyente, la mezcla se incuba a 25 °C durante 1,5 h. Después de 3 lavados el desarrollo de la reacción colorimétrica se obtiene por adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y por incubación durante 15 min a 25 °C. La reacción se inactiva por adición
 10 de 100 µl de HCl 1 N y se evalúa por la lectura espectrofotométrica a 450 nm. En la figura 5 se muestran los resultados en la reactividad de IgG específica de los sueros mezclados de los ratones inmunizados con Der p1 modificado con KCNO/PGO contra tanto el alérgeno usado para inmunizar como el equivalente no modificado (natural). Como puede observarse, los anticuerpos IgG inducidos por el tratamiento con Der p1 modificado con KCNO/PGO son capaces de reconocer también las proteínas Der p1 naturales (aunque a un nivel menor que contra
 15 las proteínas modificadas), lo que muestra que los epítomos de linfocitos T de Der p1 modificado con KCNO/PGO se conservan, y que son análogos a los presentes en el equivalente natural. Por lo tanto, Der p1 modificado con KCNO/PGO mantiene la capacidad de estimular de forma adecuada el sistema inmunitario, para así producir anticuerpos IgG específicos dirigidos también contra Der p1 natural.

20 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis se llevó a cabo usando geles de acrilamida de 4-12 % de gradiente, previamente empaquetados y usados de acuerdo con las indicaciones del fabricante (NuPAGE® Novex® mini gels, Invitrogen, Milan). Este sistema de electroforesis en lotes a pH neutro permite una resolución mejor de las bandas en el intervalo de pesos
 25 moleculares de interés para los autores de la invención.

Las muestras de Der p1, naturales o modificadas con KCNO o KCNO/PGO se evaluaron por la técnica mencionada antes, en condiciones reductoras (presencia de 2-mercaptoetanol al 5 %) mediante carga en el gel de la misma cantidad de muestra (5 µg). La separación se lleva a cabo conectando el aparato a la fuente de alimentación del
 30 microordenador de electroforesis a 400/1000 y aplicando una corriente constante de 180 mA durante aproximadamente 1 h. Al final, el gel se tiñe con Coomassie coloidal (kit de tinción de azul coloidal, Novex®, Invitrogen). Los resultados representados en la figura 6 indican que no hay diferencia en los perfiles de las muestras que se están considerando, mostrando por lo tanto que el tamaño molecular del alérgeno Der p1 no es modificado por las reacciones con KCNO/PGO y que mantiene, también el modificado, su forma monómera.

35 EJEMPLO 3

40 Procedimiento de modificación química del alérgeno principal de la ovoalbúmina con KCNO, o una combinación de KCNO/PGO

Se pesa una cantidad adecuada del alérgeno OVA comercial (Sigma Aldrich, Milán), purificada de la albúmina de huevo, y se disuelve en un volumen de tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 6,86, para alcanzar así una concentración de proteínas de 2 mg/ml, de acuerdo con Lowry. Para la modificación con KCNO, se añaden 50,25 mg de tetraborato sódico decahidrato y 101 mg de cianato potásico a 2,5 ml de disolución de OVA. Las sales se
 45 disolvieron por agitación lenta y el pH opcionalmente se ajustó a 9,3 con NaOH 1 M. La disolución resultante se mantuvo con agitación lenta durante 16 h en un baño con termostato a 40 °C en un matraz cerrado herméticamente. Durante las primeras horas, se controló el pH y se ajustó opcionalmente por adición de ácido fosfórico 1 M. La preparación así obtenida se filtró en gel otra vez en una columna G-25 para separar el exceso de reactivo, y se esterilizó con membranas de 0,22 micrómetros de Millipore. Una parte mínima de la misma se usó para los análisis sucesivos. El porcentaje de sustitución de los grupos amina del alérgeno, evaluado por el ensayo de TNBS, resultó ser de 82 %. El resto de la muestra modificada con KCNO se sometió a un segundo procedimiento de modificación química con fenilgloxal, en las condiciones experimentales descritas a continuación.

La muestra de OVA modificada con KCNO con una concentración de proteínas de 1,4 mg/ml (Lowry) se lleva a pH 8 por adición de bicarbonato sódico 0,1 M. Posteriormente a esto, se añade PGO con un exceso molar de 800 con respecto a la proteína. Con el fin de calcular el exceso molar, los autores de la invención consideraron para el alérgeno OVA un tamaño molecular de 43 kD de acuerdo con la base de datos de UniProtKB, de lo cual resultaron 15 restos de arginina. Con el fin de facilitar la disolución del PGO, este se disolvió previamente en alcohol etílico a una concentración 0,3 M. La mezcla se deja con agitación suave durante 4 h a 25 °C. Después, la reacción prosigue con la diálisis o la filtración en gel contra PBS 20 mM. El grado de sustitución de los restos de arginina resulta ser igual a 25 %. Posteriormente, la muestra de OVA modificada con KCNO/PGO se comparó, cuando era posible, con la modificada con KCNO o la natural, en términos de potencial alergénico por inhibición de EAST, capacidad inmunológica por ELISA y dimensiones moleculares por SDS-PAGE.

65 Evaluación de la alergenicidad por inhibición de EAST

Para este objetivo, se activaron con OVA perlas de poliestireno previamente tratadas con glutaraldehído, en una proporción de 1 µg de proteína por perla.

5 Al mismo tiempo, se prepara una mezcla de sueros humanos, seleccionados de pacientes con registros clínicos de alergia al huevo, confirmada por un ensayo serológico específico.

10 Se añaden a los pocillos de una placa ELISA 30 µl de diluciones seriadas en PBS-BSA al 2 % (diluyente) de las muestras que se están considerando (OVA natural, OVA modificada con KCNO, OVA modificada con KCNO/PGO), llevados previamente a la misma concentración, y 20 µl de sueros mezclados; la mezcla se deja con agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se prepara una muestra de control positivo, en la que el inhibidor está compuesto de diluyente. Al final de las dos horas, se añade una perla activada con OVA y 50 µl de PBS-BSA al 2 % a cada pocillo, y la placa se mantiene con agitación durante la noche a temperatura ambiente. Después las perlas se lavan y se añaden a cada pocillo 100 µl de una disolución de anticuerpo dirigido contra IgE humana conjugado con peroxidasa y se incuban con agitación durante 2 h. Después de 3 lavados, se obtiene el desarrollo de la reacción colorimétrica por adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y por incubación durante 15 minutos a 25 °C. La reacción se inactiva por la adición de 50 µl de HCl 1 N, y después se transfieren 100 µl de la mezcla de cada pocillo a una nueva placa, y se evalúa la intensidad del color desarrollado mediante lectura espectrofotométrica a 450 nm.

20 Las densidades ópticas detectadas se transforman en porcentajes de inhibición en relación con el control positivo y se hace una representación gráfica en la que el porcentaje de inhibición se da en el eje Y, y el logaritmo del volumen de muestra usado en el ensayo se da en el eje X. A partir de los puntos recogidos, se construye una recta de regresión lineal en la que se mide el valor de CI50, que representa el volumen en microlitros de muestra que es necesario para una inhibición de 50 % de la unión de IgE a la perla. Dicho valor es inversamente proporcional al potencial alergénico de la muestra que se está considerando.

25 Los resultados, representados en la figura 7, muestran que la modificación con KCN reduce la actividad alergénica de la OVA 178 veces, mientras que la modificación combinada con KCNO/PGO induce una reducción adicional de la actividad alergénica de la OVA, más precisamente de 1687 veces, mostrando también en este caso que la combinación secuencial de KCNO/PGO actúa por un efecto sinérgico.

Evaluación de la inmunogenicidad de la OVA modificada con KCNO/PGO por ELISA del suero de ratones previamente inmunizados

35 a) *Protocolo de inmunización de ratones*

40 Se inmunizó un grupo de ratones compuesto de 4 hembras de la cepa Balb/c (Charles River) por vía subcutánea con 200 µl de una emulsión compuesta de 100 µl de adyuvante completo de Freund y 20 µg de OVA modificada con KCNO/PGO en 100 µl de disolución fisiológica. Se llevaron a cabo otros 3 refuerzos en intervalos de 3 semanas sustituyendo el adyuvante completo por el incompleto. Siete días después de la última inmunización, se lleva a cabo una extracción de sangre de la cola de los ratones, y se comprueba por ELISA la respuesta de anticuerpos IgG contra el inmunógeno, así como la capacidad de reconocer la proteína natural.

45 b) *Procedimiento de ensayo*

50 El ensayo se lleva a cabo para verificar si el alérgeno OVA modificada con KCNO/PGO mantiene un potencial inmunogénico, referido a la capacidad para inducir en el ratón, cuando se le administra de acuerdo con el protocolo indicado a continuación, una respuesta de IgG dirigida contra la OVA natural no modificada. Para este objetivo, cantidades iguales (0,1 µg) de OVA, natural o modificada con KCNO/PGO, en tampón de carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6, se adsorben en los pocillos de placas de poliestireno para ensayos ELISA por incubación a 4 °C durante 16 h. Los pocillos después se lavan con disolución de lavado (tampón de fosfato 60 mM pH 6,5 que contenía Tween-20 al 0,05 %) y los sitios libres se saturan con disolución diluyente (suero de caballo al 25 %, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05 %, tiomersal al 0,01 % en tampón de fosfato 150 mM, pH 7,4). Se añaden a cada pocillo partes alícuotas iguales (100 µl) de diluciones seriadas de 10 veces de mezcla de sueros de ratón en tampón diluyente, y se incuban a 25 °C durante 2 h. Después de 3 lavados, se añade el suero de conejo dirigido contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa en una dilución de 1: 2000 en tampón diluyente, la mezcla se incubaba a 25 °C durante 1,5 h. Después de 3 lavados el desarrollo de la reacción colorimétrica se obtiene por adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y por incubación durante 15 min a 25 °C. La reacción se inactiva por adición de 100 µl de HCl 1 N y se evalúa por la lectura espectrofotométrica a 450 nm. Los resultados en la reactividad de IgG específica de los sueros mezclados de los ratones inmunizados con OVA modificada con KCNO/PGO contra tanto el alérgeno usado para inmunizar como el equivalente no modificado (natural), se muestran en la figura 8. Como puede observarse, los anticuerpos IgG inducidos por el tratamiento con OVA modificada con KCNO/PGO son capaces de reconocer también las proteínas de OVA naturales (aunque a un nivel menor que contra las proteínas modificadas), lo que muestra que los epítomos de linfocitos T de OVA modificada con KCNO/PGO se conservan, y que son análogos a los presentes en el equivalente natural. Por lo tanto, la OVA modificada con KCNO/PGO mantiene la

capacidad de estimular de forma adecuada el sistema inmunitario, para así producir anticuerpos IgG específicos dirigidos también contra las proteínas de OVA natural.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

5 La electroforesis se llevó a cabo usando geles de acrilamida de 4-12 % de gradiente, previamente empaquetados y usados de acuerdo con las indicaciones del fabricante (NuPAGE® Novex® mini gels, Invitrogen, Milan). Este sistema de electroforesis en lotes a pH neutro permite una resolución mejor de las bandas en el intervalo de pesos moleculares de interés para los autores de la invención.

10 Las muestras de OVA natural o modificada con KCNO o KCNO/PGO se evaluaron por la técnica mencionada antes, en condiciones reductoras (presencia de 2-mercaptoetanol al 5 %) mediante carga en el gel de la misma cantidad de muestra (5 µg). La separación se lleva a cabo conectando el aparato a la fuente de alimentación del microordenador de electroforesis a 400/1000 y aplicando una corriente constante de 180 mA durante aproximadamente 1 h. Al final, el gel se tiñe con Coomassie coloidal (kit de tinción de azul coloidal, Novex®, Invitrogen). Los resultados en la figura 9 muestran que la reacción con KCNO/PGO no implica variaciones significativas del tamaño molecular del alérgeno OVA, que mantiene, también cuando está modificado, su forma monómera.

EJEMPLO 4

20 Procedimiento de modificación química del alérgeno principal del melocotón Pru p3 obtenido de forma recombinante, con KCNO o con una combinación de KCNO/PGO

Etapa de purificación del alérgeno rPru pr en E. coli

25 El ADNc de Pru p3 se obtiene por amplificación de la secuencia de nucleótidos AY792996 contenida en el clon PP LEa0029C22F (GenBank, nº de acceso BU047210), proporcionado por el Genomics Institute of Clemson University (EE.UU.). Los oligonucleótidos usados en la reacción de amplificación PCR (reacción en cadena de la polimerasa) son Pru p 3-6H ECO (5' ccg gaa ttc cat atg cat cac cat cac ata aca tgt ggc caa gtg), y Pru p 3 Bam (5' cgc gga tcc tca ctt cac ggt ggc gc), corresponden a las secuencias 5' y 3'-terminales del transcrito correspondiente a la proteína madura. Las secuencias subrayadas son los sitios de escisión de las enzimas de restricción EcoRI, NdeI, y BamHI, necesarias para la clonación en la amplificación y vectores de expresión, y está resaltada en *itálica* la secuencia que codifica 6 restos de histidina. El ADNc obtenido, después de purificación, se insertó en el vector de expresión, se amplificó y se envió para verificar que la secuencia era correcta por secuenciación automática (M-Medical/MWG-Biotech).

40 La expresión de Pru p3 se produce en células de *Escherichia coli* BL21 Origami (DE3) (Stratagene), cultivadas a 37 °C en presencia de antibióticos (Amp 100 µg/ml, Kan 15 µg/ml y Tet 12,5 µg/ml), hasta una densidad correspondiente a DO600 = 0,6, y se induce por la adición de IPTG 1 mM al medio de cultivo. Después de crecimiento durante 16 h a 25 °C, las células se recogen por centrifugación, se vuelven a suspender en NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8, y se lisan por tratamiento con ultrasonidos. Las proteínas recombinantes solubles, separadas de los residuos insolubles por centrifugación, se purifican por cromatografía de afinidad en una columna NiNTA de Agarosa (Qiagen, Italia), que une la secuencia de histidina, siguiendo las instrucciones del fabricante.

45 La proteína así purificada, con un grado de pureza superior a 98 % como se muestra por el perfil de SDS-PAGE, se cuantifica por la lectura espectrofotométrica a 280 nm, considerando su coeficiente de extinción molar (E_{280}) igual a 3480, y por lo tanto la absorbancia a una concentración de 1 mg/ml igual a 0,345. Finalmente, la disolución de Pru p3 se dializa contra H₂O y después se liofiliza en presencia de sacarosa al 1 %.

50 La muestra de rPru p3 liofilizada se recoge después en un volumen de tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 6,86, para alcanzar así una concentración de proteínas de 0,7 mg/ml. Para la modificación con KCNO, se añaden 50,25 mg de tetraborato sódico decahidrato y 101,4 mg de cianato potásico a 2,5 ml de disolución de rPru p3. Las sales se disolvieron por agitación lenta y el pH opcionalmente se ajustó a 9,3 con NaOH 1 M. La disolución resultante se mantuvo con agitación lenta durante 16 h en un baño con termostato a 40 °C en un matraz cerrado herméticamente. Durante las primeras horas, se controló el pH y opcionalmente se ajustó por adición de ácido fosfórico 1 M. La preparación así obtenida se filtró en gel otra vez en una columna G-25 para separar el exceso de reactivo, y se esterilizó con membranas de 0,22 micrómetros de Millipore. Una parte mínima de la misma se usó para los análisis sucesivos. El porcentaje de sustitución de los grupos amina de rPru p3, evaluado por el ensayo de TNBS, resultó ser igual a 74 %. El resto de la muestra modificada con KCNO se sometió a un segundo procedimiento de modificación química con fenilgloxal, en las condiciones experimentales descritas a continuación.

65 La muestra de rPru p3 modificada con KCNO con una concentración de proteínas de 0,5 mg/ml se lleva a pH 8 por adición de bicarbonato sódico 0,1 M. Posteriormente a esto, se añade PGO con un exceso molar de 800 con respecto a la proteína. Con el fin de calcular el exceso molar, se consideró para el alérgeno rPru p3 un tamaño molecular de 10 KD de acuerdo con la base de datos UniProtKB, de lo cual resultan 4 restos de arginina. Con el fin de facilitar la disolución del PGO, éste se disolvió previamente en alcohol etílico a una concentración 0,3 M. La

mezcla se deja con agitación suave durante 4 h a 25 °C. Después, la reacción prosigue con la diálisis o la filtración en gel contra PBS 20 mM. El grado de sustitución de los restos de arginina resulta ser igual a 50 %. Posteriormente, la muestra de Pru p3 modificada con KCNO/PGO se comparó con la modificada con KCNO o la natural, en términos de potencial alergénico por inhibición de EAST, capacidad inmunológica por ELISA y dimensiones moleculares por SDS-PAGE.

Evaluación de la alergenicidad por inhibición de EAST

Para este objetivo, se activaron con Pru p3 perlas de poliestireno previamente tratadas con glutaraldehído, en una proporción de 1 µg de proteína por perla.

Al mismo tiempo, se prepara una mezcla de sueros humanos, seleccionados de pacientes con registros clínicos de alergia al melocotón, confirmado por ensayo serológico específico.

Se añaden a los pocillos de una placa ELISA 30 µl de diluciones seriadas en PBS-BSA al 2 % (diluyente) de las muestras que se están considerando (Pru p3 natural, Pru p3 modificado con KCNO, Pru p3 modificado con KCNO/PGO), llevados previamente a la misma concentración, y 20 µl de sueros mezclados; la mezcla se deja con agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se prepara una muestra de control positivo, en la que el inhibidor está compuesto de diluyente. Al final de las dos horas, se añaden una perla activada con Pru p3 y 50 µl de PBS-BSA al 2 % a cada pocillo, y la placa se mantiene con agitación durante la noche a temperatura ambiente. Después las perlas se lavan y se añaden a cada pocillo 100 µl de una disolución de anticuerpo dirigido contra IgE humana conjugado con peroxidasa y se incuban con agitación durante 2 h. Después de 3 lavados, se obtiene el desarrollo de la reacción colorimétrica por adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y por incubación durante 15 minutos a 25 °C. La reacción se inactiva por la adición de 50 µl de HCl 1 N, y después se transfieren 100 µl de la mezcla de cada pocillo a una nueva placa, y se evalúa la intensidad del color desarrollado mediante lectura espectrofotométrica a 450 nm.

Las densidades ópticas detectadas se transforman en porcentajes de inhibición en relación con el control positivo y se hace una representación gráfica en la que el porcentaje de inhibición se da en el eje Y, y el logaritmo del volumen de muestra usado en el ensayo se da en el eje X. A partir de los puntos recogidos, se construye una recta de regresión lineal en la que se mide el valor de CI50, que representa el volumen de muestra en microlitros que es necesario para una inhibición de 50 % de la unión de IgE a la perla. Dicho valor es inversamente proporcional al potencial alergénico de la muestra que se está considerando.

Los resultados, representados en la figura 10, muestran que la modificación con KCN reduce la actividad alergénica del rPru p3 64 veces, mientras que la modificación con KCNO/PGO reduce más la actividad mencionada antes, que resulta ser 1422 veces inferior que el equivalente natural.

Evaluación de la inmunogenicidad del alérgeno Pru p3 modificado con KCNO/PGO por ELISA del suero de ratones previamente inmunizados

a) Protocolo de inmunización de ratones

Se inmunizó un grupo de ratones compuesto de 4 hembras de la cepa Balb/c (Charles River) por vía subcutánea con 200 µl de una emulsión compuesta de 100 µl de adyuvante completo de Freund y 20 µg de Pru p3 modificado con KCNO/PGO en 100 µl de disolución fisiológica. Se llevaron a cabo otros 3 refuerzos en intervalos de 2 semanas sustituyendo el adyuvante completo por el incompleto. Siete días después de la última inmunización, se lleva a cabo una extracción de sangre de la cola de los ratones, y se comprueba por ELISA la respuesta de anticuerpos contra el inmunógeno, así como la capacidad de reconocer la proteína natural.

b) Procedimiento de ensayo

El ensayo se lleva a cabo para verificar si Pru p3 modificado con KCNO/PGO mantiene un potencial inmunogénico, referido a la capacidad para inducir en el ratón, cuando se le administra de acuerdo con el protocolo indicado a continuación, una respuesta de IgG dirigida contra Pru p3 natural no modificado. Para este objetivo, cantidades iguales (0,1 µg) de Pru p3 natural o modificado con KCNO/PGO, en tampón de carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6, se adsorben en los pocillos de placas de poliestireno para ensayos ELISA por incubación a 4 °C durante 16 h. Los pocillos después se lavan con disolución de lavado (tampón de fosfato 60 mM pH 6,5 que contiene Tween-20 al 0,05 %) y los sitios libres se saturan con disolución diluyente (suero de caballo al 25 %, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05 %, tiomersal al 0,01 % en tampón de fosfato 150 mM, pH 7,4). Se añaden a cada pocillo partes alícuotas iguales (100 µl) de diluciones seriadas de 10 veces de mezcla de sueros de ratón en tampón diluyente, y se incuban a 25 °C durante 2 h. Después de 3 lavados, se añade el suero de conejo dirigido contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa en una dilución de 1: 2000 en tampón diluyente, la mezcla se incuba a 25 °C durante 1,5 h. Después de 3 lavados el desarrollo de la reacción colorimétrica se obtiene por adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y por incubación durante 15 min a 25 °C. La reacción se inactiva por adición de 100

µl de HCl 1 N y se evalúa por la lectura espectrofotométrica a 450 nm. Los resultados en la reactividad de IgG específica de los sueros mezclados de los ratones inmunizados con Pru p3 modificado con KCNO/PGO contra tanto el Pru p3 usado para inmunizar como el equivalente no modificado (natural) se muestran en la figura 11. Como puede observarse, en la figura 11 los anticuerpos IgG inducidos por el tratamiento con Pru p3 modificado con KCNO/PGO son capaces de reconocer también las proteínas Pru p3 naturales, lo que muestra que los epítopos de linfocitos T de Pru p3 modificado con KCNO/PGO se conservan, y que son análogos a los presentes en el equivalente natural. Por lo tanto, Pru p3 modificado con KCNO/PGO mantiene la capacidad de estimular de forma adecuada el sistema inmunitario, para así producir anticuerpos IgG específicos dirigidos también contra las proteínas Pru p3 naturales.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis se llevó a cabo usando geles de acrilamida de 4-12 % de gradiente, previamente empaquetados y usados de acuerdo con las indicaciones del fabricante (NuPAGE® Novex® mini gels, Invitrogen, Milan). Este sistema de electroforesis en lotes a pH neutro permite una resolución mejor de las bandas en el intervalo de pesos moleculares de interés para los autores de la invención.

Las muestras de Pru p3 natural o modificado con KCNO o KCNO/PGO se evaluaron por la técnica mencionada antes, en condiciones reductoras (presencia de 2-mercaptoetanol al 5 %) mediante carga en el gel de la misma cantidad de muestra (5 µg). La separación se lleva a cabo conectando el aparato a la fuente de alimentación del microordenador de electroforesis a 400/1000 y aplicando una corriente constante de 180 mA durante aproximadamente 1 h. Al final, el gel se tiñe con Coomassie coloidal (kit de tinción de azul coloidal, Novex®, Invitrogen). Los resultados en la figura 12 muestran que el tamaño molecular del alérgeno Pru p3 no cambia después de la modificación con KCNO/PGO, manteniendo así su forma monómera.

El extracto alérgico o las proteínas purificadas individuales modificados como se ha descrito antes, se pueden usar en la terapia de pacientes alérgicos, y administrar por la vía parenteral, o nasal o sublingual o bucomucosal u oral u bronquial, con un dispositivo adecuado. El producto antes mencionado se puede preparar también en una forma liofilizada, y después reconstituir y administrar como se ha indicado para la forma acuosa, o incorporar en sistemas de suministro (p. ej. liposomas), o como un polvo que se incorpora en un excipiente inerte, p. ej., lactosa, para administrar por la vía nasal o bronquial por un dispositivo especial, o formular en comprimidos opcionalmente con disolución rápida para la administración sublingual/bucomucosal, o cápsulas que opcionalmente están hechas gastrorresistentes, por un procedimiento adecuado para la administración oral, o en forma de biopelículas o polvos mucoadhesivos para aumentar el tiempo de contacto con la mucosa bucal y facilitar la interacción con las células dendríticas locales.

El producto antes mencionado también se puede preparar en forma de suspensión aceitosa, jarabe, elixir, con adición opcional de excipientes o sustancias para hacerlo sabroso para una administración sublingual, bucomucosal u oral.

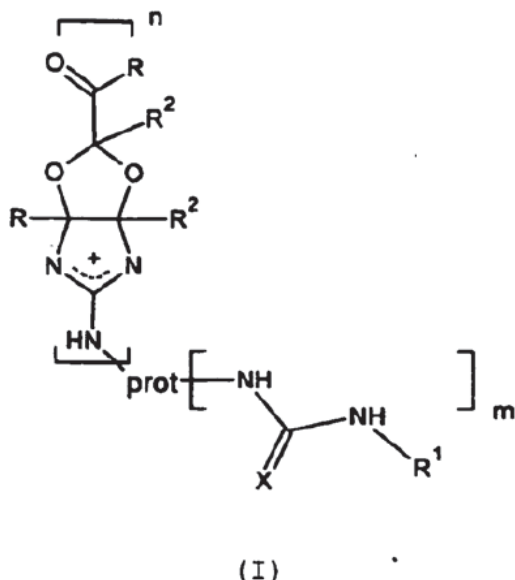
El producto mencionado antes también se puede asociar o conjugar con sustancias que se sabe que expresan una actividad de adyuvante del tipo Th1 o Treg, tal como por ejemplo, CpG, derivados bacterianos, micobacterias, micoplasmas, Neisseria, virus o protozoos, incluidos CpG no metilados, lipoproteínas, o lipopéptidos triacilados, lipopolisacáridos (LPS) y derivados del lípido de tipo A, sustancias de síntesis tales como imiquimod, resiquimod, poly(I: C).

La composición de la invención en general podrá contener diferentes excipientes y/o vehículos adaptados al tipo de administración seleccionada, de acuerdo con los que conocen los expertos en la materia, y lo que se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., N.Y., USA, 17ª edición, 1985.

En todas estas formulaciones farmacéuticas, la preparación de la invención podrá estar presente en cantidades en el intervalo entre 0,5 µg (dosis mínima) y 200 µg (dosis de mantenimiento) de la proteína total, de acuerdo con la vía de administración que se usa en la implementación de la inmunoterapia específica.

REIVINDICACIONES

1. Alérgenos modificados que tienen alergenicidad reducida comparado con el correspondiente material alérgico natural, y caracterizados porque todos o una parte de los grupos amina primaria de los restos de lisina y arginina de las moléculas alérgicas se funcionalizan como se muestra en la estructura (I), y porque dichos alérgenos modificados tienen la siguiente estructura (I):



- 10 en la que:

R y R² se seleccionan independientemente de H, alquilo C1-C5, fenilo, opcionalmente sustituido en orto, meta o para con un grupo hidroxilo, alcoxi C1-C4, halógeno, amino, alquilamino, dialquilamino, mercapto, alquilmercapto C1-C4;

- 15 X representa O, S o NR₃, en el que R₃ es H, alquilo con 1-6 átomos de carbono, fenilo o CN;

R₁ representa H, alquilo con 1-8 átomos de carbono, fenilo o arilalquilo con hasta 8 átomos de carbono, o alquilo que contiene un anillo heterocíclico;

- 20 prot representa el resto de proteína del alérgeno;

n es el número de grupos arginina funcionalizados, y está en el intervalo entre 1 y el número de grupos arginina presentes en el alérgeno;

- 25 m es el número de grupos lisina funcionalizados y está en el intervalo entre 1 y el número de grupos lisina presentes en el alérgeno.

2. Los alérgenos modificados de acuerdo con la reivindicación 1, en los que dicho material alérgico natural sometido a modificación se puede obtener de ácaros, pólenes, epitelio de animales, micofitos, proteínas de origen alimentario, preferiblemente seleccionadas de proteínas de la leche, huevos, cereales, melocotón, manzana, por extracción de las proteínas alérgicas con un disolvente adecuado; o dicho material alérgico natural está compuesto de proteínas purificadas de las materias primas listadas antes; o dicho material alérgico natural se obtiene en una forma recombinante.

3. Los alérgenos modificados de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en los que el porcentaje medio de grupos amina primaria modificados de las lisinas está en el intervalo entre 75 % y 100 %, preferiblemente aproximadamente 90 %; y el porcentaje medio de los restos de arginina sustituidos está en el intervalo entre 25 y 100 %, preferiblemente aproximadamente 40 %.

4. Los alérgenos modificados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en los que R es fenilo, opcionalmente sustituido en orto, meta o para con un grupo hidroxilo, alcoxi C1-C4, halógeno, amino, alquilamino, dialquilamino, mercapto, alquilmercapto C1-C4, y R₂ es hidrógeno.

5. Los alérgenos modificados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que X es O o S, y

R1 es hidrógeno.

6. Los alérgenos modificados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en los que R es fenilo, R1 y R2 son hidrógeno, y X es O o S.

5 7. Un método para obtener alérgenos modificados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las siguientes etapas:

10 a) reacción de carbamitación o tiocarbamitación de todos o una parte de los restos de lisina de una materia prima alérgica natural;

b) posteriormente, reacción de todos o una parte de los restos de arginina de dicho material alérgico de la etapa a) con un dialdehído o dicetal.

15 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha reacción de carbamitación de la etapa a) se lleva a cabo haciendo reaccionar dicho material alérgico natural con cianato potásico a una concentración final de la sal en el intervalo entre 0,1 M y 1,5 M, preferiblemente entre 0,4 M y 0,8 M, y manteniendo el pH entre 7 y 11, preferiblemente entre 9 y 9,6; a una temperatura en el intervalo entre la temperatura ambiente y 50 °C, preferiblemente entre 35 y 40 °C, durante un tiempo de reacción total en el intervalo entre 12 y 36 horas, preferiblemente entre 16 y 24 horas.

20 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que entre dicha etapa a) y dicha etapa b), el material alérgico natural así modificado se somete a filtración en gel para separar el exceso de reactivo y se equilibra con una disolución salina adecuada.

25 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dicha etapa b) se lleva a cabo por reacción con fenilgloxal, con un exceso molar en el intervalo entre 100 y 1600, preferiblemente entre 400 y 800, durante un periodo de tiempo en el intervalo entre 30 min y 8 h, preferiblemente 4 h, a temperaturas en el intervalo entre 20 y 37 °C, preferiblemente 25 °C.

30 11. Una composición farmacéutica que comprende una dosis eficaz para la inmunoterapia de uno o más alérgenos modificados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 12. Los alérgenos modificados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para usar en inmunoterapia específica, en los que dichos alérgenos modificados tienen la capacidad de inducir anticuerpos IgG específicos capaces de reconocer también el correspondiente alérgeno natural, pero menor capacidad de unirse a los anticuerpos IgE específicos.

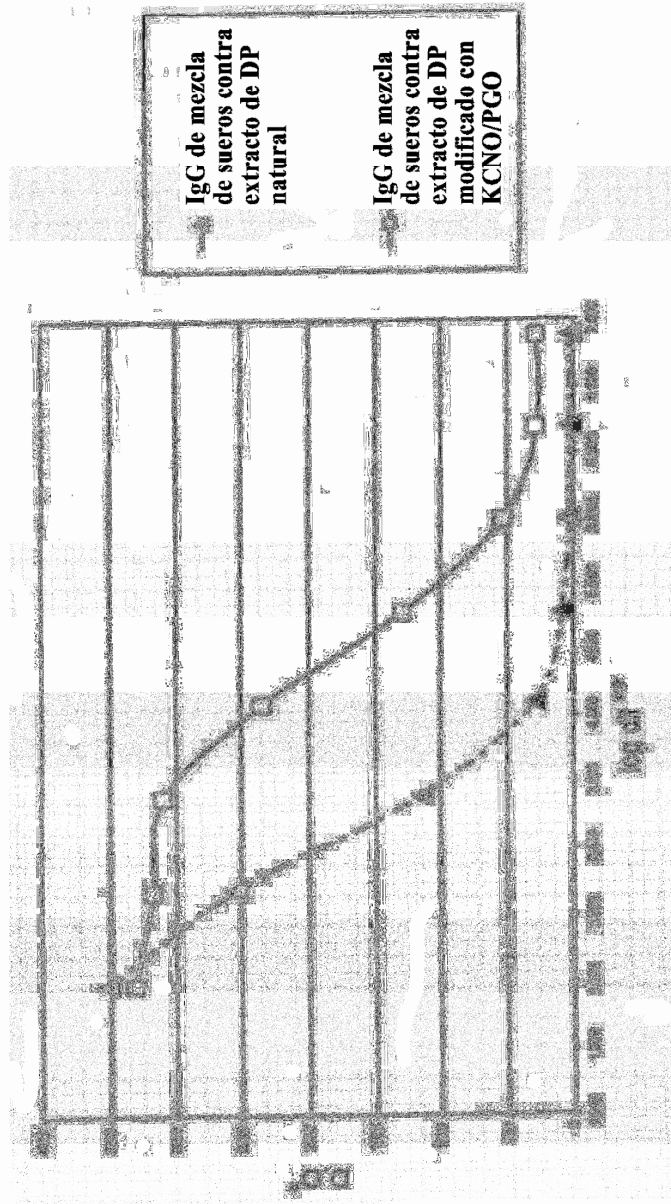
Figura 1. Evaluación de la actividad alérgica del extracto de DP antes (natural) y después de modificación con KCNO o KCNO/PGO

	C50* (µl)	MOD/NAT
Natural	0,0012	-
KCNO	0,0223	18
KCNO/PGO	0,2811	227

C50: Volumen de muestra (microlitros) necesario para mostrar un 50% de inhibición de la unión de IgE a la perla. Dicho valor es inversamente proporcional a la actividad alérgica de la muestra que se considera.

La columna de MOD/NAT indica en cuantas veces se reduce la actividad alérgica de la muestra que se considera comparada con el equivalente natural.

Figura 2. Reactividad de la IgG en el suero de ratones inmunizados con extracto de DP modificado con KCNO/PGO



Se mezclaron sueros extraído de animales inmunizados y se ensayaron por ELISA en diferentes diluciones (desde 1:1000 en base 5) contra extracto de DP modificado con KCNO/PGO o contra extracto de DP natural

*D.O.: Absorbancia a 450 nm

**log dil: logaritmo en base 10 de la dilución de la mezcla

Figura 3. Perfil de proteínas del extracto de DP natural, modificado con KCNO o modificado con KCNO-PGO

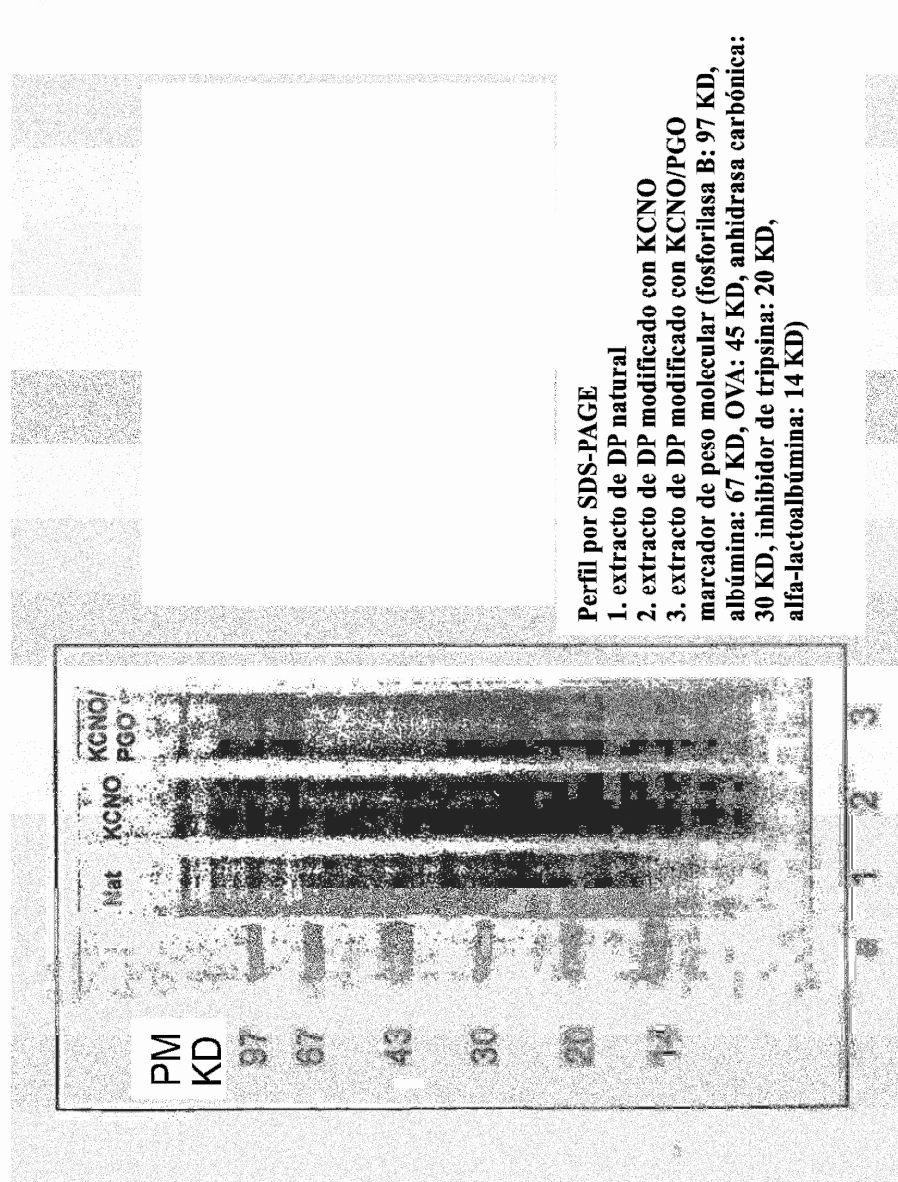


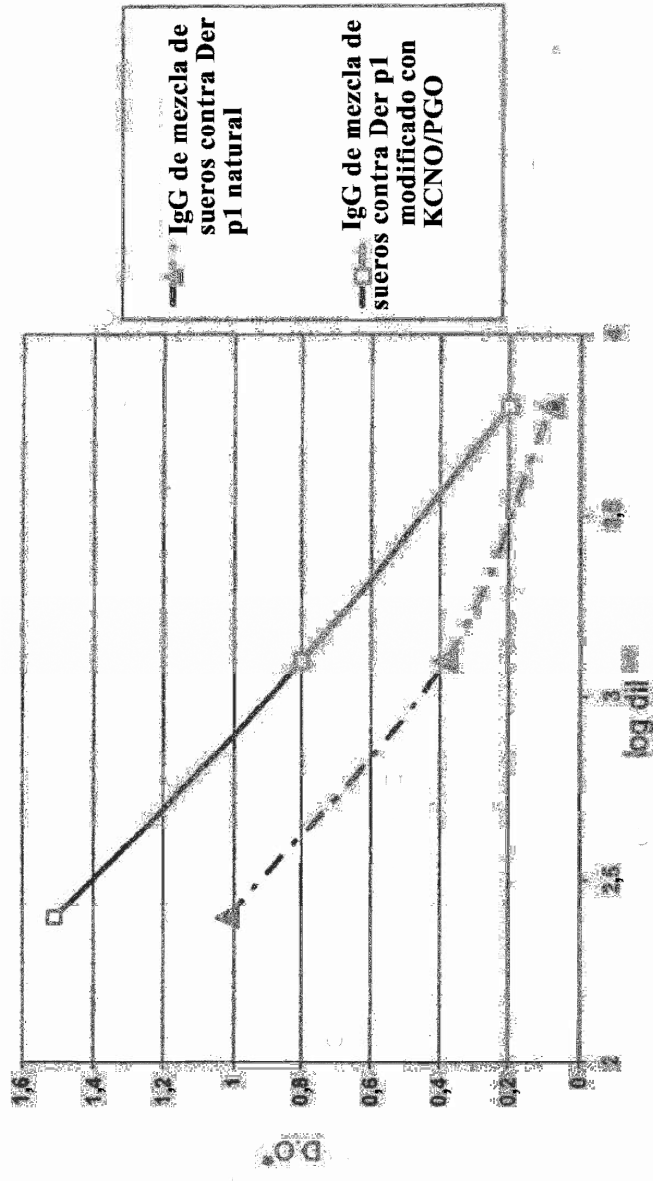
Figura 4. Evaluación de la actividad alérgica de Der p1 antes (natural) y después de modificación con KCNO o KCNO/PGO

	C50*(µl)	MOD/NAT
Natural	0,07	-
KCNO	1,26	16
KCNO/PGO	22,89	303

C50: Volumen de muestra (microlitros) necesario para mostrar un 50% de inhibición de la unión de IgE a la perla. Dicho valor es inversamente proporcional a la actividad alérgica de la muestra que se considera.

La columna de MOD/NAT indica en cuantas veces se reduce la actividad alérgica de la muestra que se considera comparada con el equivalente natural.

Figura 5. Reactividad de la IgG en el suero de ratones inmunizados con Der p1 modificado con KCNO/PGO

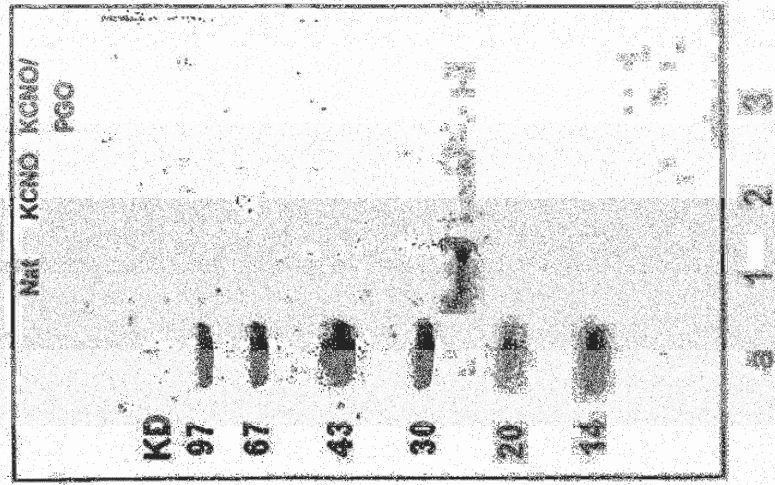


Se mezclaron sueros extraído de animales inmunizados y se ensayaron por ELISA en diferentes diluciones (desde 1:1000 en base 5) contra Der p1 modificado con KCNO/PGO o contra Der p1 natural

*D.O.: Absorbancia a 450 nm

**log dil: logaritmo en base 10 de la dilución de la mezcla

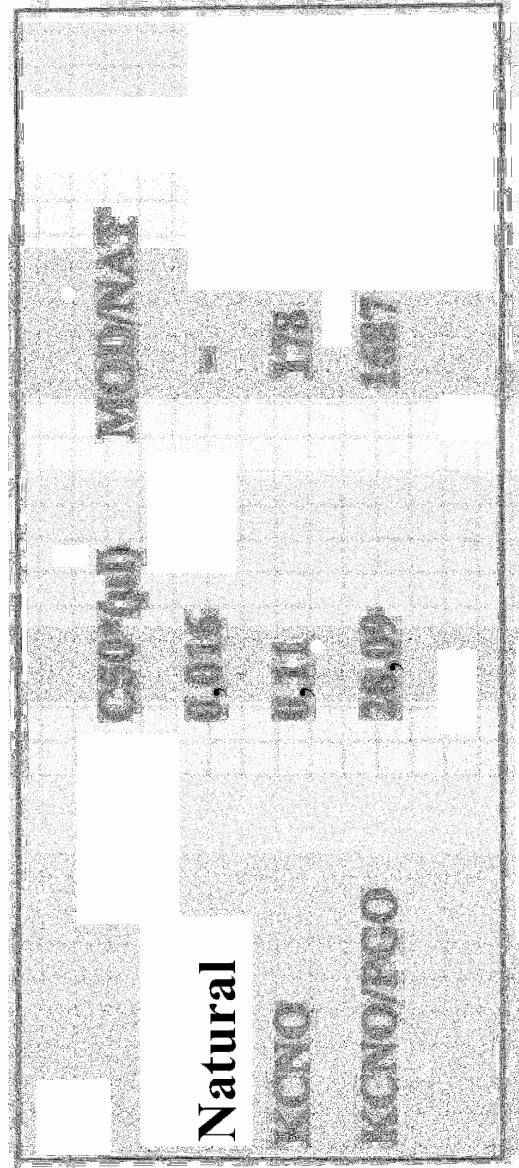
Figura 6. Perfil del alérgeno Der p1 natural, modificado con KCNO o modificado con KCNO/PGO



Perfil por SDS-PAGE

1. Der p1 natural
 2. Der p1 modificado con KCNO
 3. Der p1 modificado con KCNO/PGO
- marcador de peso molecular (fosforilasa B: 97 KD, albúmina: 67 KD, OVA: 45 KD, anhidrasa carbónica: 30 KD, inhibidor de tripsina: 20 KD, alfa-lactoalbúmina: 14 KD)

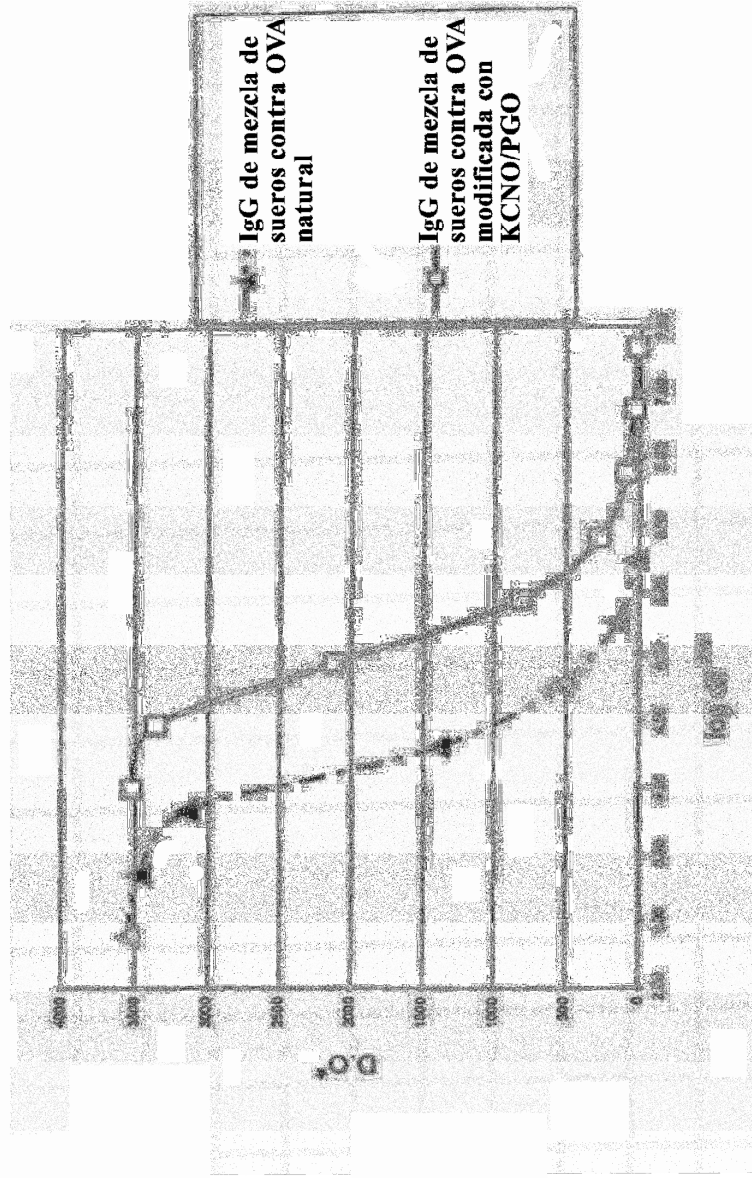
Figura 7. Evaluación de la actividad alérgénica de la ovoalbúmina antes (natural) y después de modificación con KCNO o KCNO/PGO



C50: Volumen de muestra (microlitros) necesario para mostrar un 50% de inhibición de la unión de IgE a la perla. Dicho valor es inversamente proporcional a la actividad alérgénica de la muestra que se considera.

La columna de MOD/NAT indica en cuantas veces se reduce la actividad alérgénica de la muestra que se considera comparada con el equivalente natural.

Figura 8. Reactividad de la IgG en el suero de ratones inmunizados con ovoalbúmina modificada con KCNO/PGO



Se mezclaron sueros extraído de animales inmunizados y se ensayaron por ELISA en diferentes diluciones (desde 1:1000 en base 5) contra OVA modificada con KCNO/PGO o contra OVA natural

*D.O.: Absorbancia a 450 nm

**log dil: logaritmo en base 10 de la dilución de la mezcla

Figura 9. Perfil de la ovoalbúmina natural, modificada con KCNO o modificada con KCNO/PGO

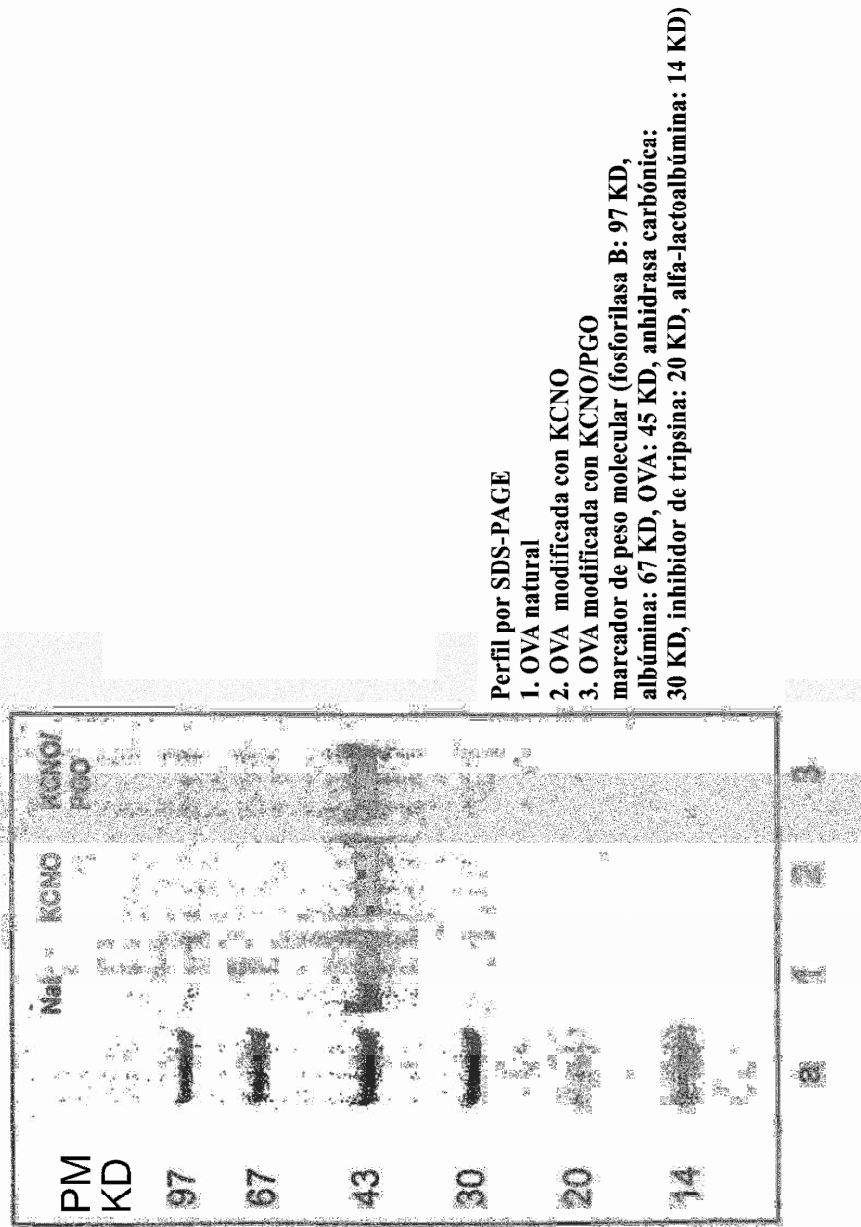
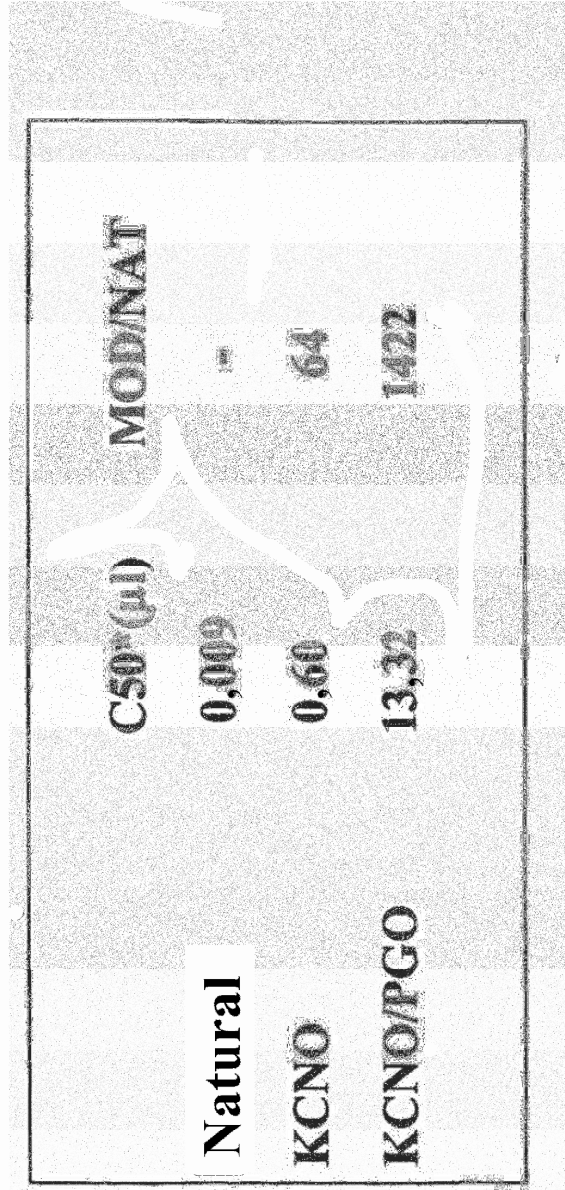
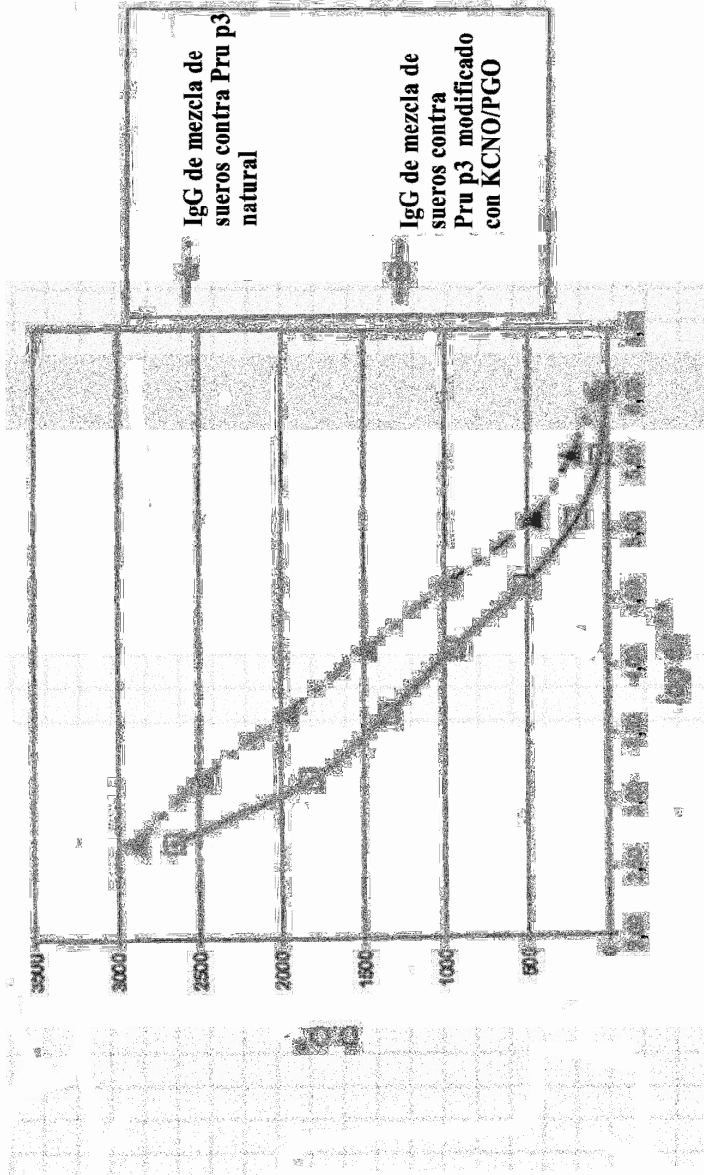


Figura 10. Evaluación de la actividad alérgica de Pru p3 recombinante antes (natural) y después de modificación con KCNO o KCNO/PGO



C50: Volumen de muestra (microlitros) necesario para mostrar un 50% de inhibición de la unión de IgE a la perla. Dicho valor es inversamente proporcional a la actividad alérgica de la muestra que se considera. La columna de MOD/NAT indica en cuantas veces se reduce la actividad alérgica de la muestra que se considera comparada con el equivalente natural.

Figura 11. Reactividad de la IgG en el suero de ratones inmunizados con Pru p3 recombinante modificado con KCNO/PGO



Se mezclaron sueros extraído de animales inmunizados y se ensayaron por ELISA en diferentes diluciones (de 1:1000 en base 5) contra rPru p3 modificado con KCNO/PGO o contra rPru p3 natural
 *D.O.: Absorbancia a 450 nm
 **log dil: logaritmo en base 10 de la dilución de la mezcla

Figura 12. Perfil del alérgeno Pru p3 recombinante antes (natural) o después de modificación con KCNO/PGO

