

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 074**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 31/593 (2006.01)

A61K 31/616 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2004 E 07105399 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 1842550**

54 Título: **Composición para inducir inmunotolerancia**

30 Prioridad:

28.03.2003 EP 03075909

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

13.05.2013

73 Titular/es:

**HAL ALLERGY HOLDING B.V. (100.0%)
PARKLAAN 125
2011 KT HAARLEM, NL**

72 Inventor/es:

**VAN OOSTERHOUT, ANTONIUS JOSEPHUS
MARIA;
KAPSENBERG, MARTIEN LUKAS;
WELLER, FRANK REINOUD;
TAHER, YOUSEF AL-MADANE;
LOBATO-VAN ESCH, ELISABETH CATHARINA
ADRIANA MARIA y
VISSERS, JOOST LAMBERT MAX**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 403 074 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para inducir inmunotolerancia.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la inducción de tolerancia frente a un alérgeno, específicamente a la inmunización con alérgeno y a la inhibición de la producción de moléculas coestimulantes en células que presentan antígeno. La invención proporciona composiciones para usar en métodos de tratamiento de patologías alérgicas.

Inmunidad adaptativa y tolerancia periférica

10 La inmunidad adaptativa se inicia mediante la estimulación, específica de antígeno, de células T naturales por complejos peptídicos MHC, clase I ó II, expresados por células que presentan antígeno (APCs, a saber, células dendríticas, macrófagos, monocitos, linfocitos B). Sin embargo, las respuestas eficaces requieren la estimulación adicional de las células T naturales por moléculas “coestimulantes” expresadas por esas APCs (Baxter et al., 2002; Matzinger, 2002). La expresión de moléculas “coestimulantes” es parte de la respuesta inmunitaria innata inducida por sustancias medioambientales biológicamente activas (patógenos o cualquier compuesto biológicamente activo, con inclusión de alérgenos) que afectan a células inmunitarias inespecíficas, migratorias, y/o a células tisulares residentes.

15 La expresión en APC es inducida directamente por la actividad biológica de sustancias medioambientales, y/o indirectamente por los ‘productos de reactividad (mediadores de estrés e inflamatorios, células necróticas) generados en respuesta a esas sustancias por otras células dentro del microambiente tisular de APC (Gallucci et al., 2001).

20 La reactividad de células inmunitarias inespecíficas, tales como APCs y células residentes, a esos compuestos biológicamente activos, es parte de la respuesta inmunitaria innata y es desencadenada en la mayor parte de los casos, si no en todos, mediante los caminos de transducción de señales de NF- κ B y/o el de MAPK/AP-1. Los caminos de activación de la inmunidad innata son desencadenados por compuestos que incluyen, pero no se limitan a:

25 1. “Tipos moleculares asociados a patógenos” (PAMPs) presentes en endotoxinas, peptidoglicanos, hidratos de carbono y otros constituyentes microbianos, por los denominados “receptores de reconocimiento de tipos” (PRR) que incluyen los receptores tales como puertas de paso (toll-like), receptores de captación de desechos y receptores de lectinas (Pulendran et al., 2001; Reis e Sousa, 2001), Los PRR reconocen no solo moléculas exógenas, sino también moléculas endógenas tales como proteínas de choque térmico y hialuronano.

30 2. Mediadores de estrés oxidativo generados dentro del microambiente de APC.

3. Proteínas de choque térmico que afectan a las APCs por interacción con diferentes receptores de la membrana celular tales como el CD91 y receptores 2 y 4 “toll-like” (Gallucci et al., 2001)

4. Nucleótidos intracelulares tales como ATP y UTP (Gallucci et al., 2001).

35 5. Enzimas proteolíticas que son liberadas localmente desde células residentes o que son proporcionadas por el propio antígeno y que pueden activar esos factores de transcripción por medio de la familia de receptores activados por proteasas. A este respecto es importante apreciar que muchos alérgenos poseen actividades proteolíticas (Gallucci et al., 2001). Además, los alérgenos pueden activar directamente también el NF- κ B de células epiteliales de las vías respiratorias y el enfrentamiento con alérgeno activa rápidamente el NF- κ B del epitelio de las vías respiratorias en un modelo de asma en animales.

40 6. La familia de receptores citosólicos de reconocimiento de tipos para patógenos intracelulares que se denomina dominio de oligodimerización de unión de nucleótidos (NOD), llamada también dominio de reclutamiento de caspasa (CARD).

45 La familia NF- κ B de factores de transcripción y el factor de transcripción AP-1 desempeñan un papel fundamental en la coordinación de la expresión de una amplia variedad de genes que regulan respuestas inmunitarias e inflamatorias, que incluyen citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión a células, moléculas coestimulantes, factores de complemento y factores antiapoptóticos (Herlaar et al., 1999; McKay et al., 1999). Al tiempo que estas moléculas son fundamentales en las respuestas inmunitarias innatas, inician también y ajustan respuestas inmunitarias adaptativas a esos compuestos por estimulación de APCs, en particular células dendríticas (DC), expresando moléculas de “coestimulación” que inquietan eficazmente a las células T naturales. Las DC residen en tejidos periféricos al estado de células inmaduras altamente endocíticas, con baja expresión de moléculas coestimulantes. La activación de DCs inmaduras por exposición a ciertos compuestos medioambientales o de estrés induce su maduración que lleva a DC maduras con alta expresión de la superficie celular de moléculas de MHC complejadas con péptidos procedentes de proteínas que han sido internalizadas en su etapa inmadura, y alta expresión de la superficie celular de moléculas de “coestimulación”. Por consiguiente, las DC maduras activan

eficazmente las células T naturales frente a proteínas que provienen de péptidos, procedentes de los compuestos medioambientales.

5 Las DC maduras promueven el desarrollo de subconjuntos de células T inmunógenas (tales como Th1 ó Th2) y/o tolerógenas (tales como las células reguladoras Treg, Tr1 ó Th3). pero el equilibrio de estos subconjuntos depende fuertemente del modo en que la DC madura haya sido activada en su etapa inmadura. Dado que diferentes patógenos activan DC inmaduras de modos diferentes dando por resultado fenotipos funcionales diferentes de DC maduras, las DC pueden ajustar la clase de respuesta inmunitaria específica al patógeno invasor. Idealmente, este proceso da por resultado protección contra este patógeno por medio de células T inmunógenas, sin patología letal para el tejido hospedador inducida por la actividad de estas células Th, El desarrollo selectivo de subconjuntos de células T está dirigido por los niveles selectivos de expresión de moléculas de la superficie celular tales como moléculas coestimulantes (CD40, proteínas de la familia B7, y otras) y por la producción de citoquinas que alteran las células T (IL-12, IFNs de tipo 1, IL-10, TGF- β , y otras).

10 Lo más importantemente, en condiciones de estado estacionario, en ausencia de compuestos medioambientales biológicamente activos o de reacciones de estrés, las células T ajustan continuamente las DC inmaduras con moléculas de "coestimulación" de baja expresión La activación de células Th en ausencia de "coestimulación" resulta también en el desarrollo de células T reguladoras que median en la tolerancia a autoantígenos, transportados por estas DC de modo que se encuentran presentes en todas partes, otro nivel de protección frente la autoinmunidad.

15 La tolerancia periférica puede definirse como el fallo a la respuesta a un antígeno por una respuesta inmunitaria adaptativa, y es adquirida por linfocitos maduros existente en tejidos periféricos. Aunque todavía no se comprenden completamente, los mecanismos de acción de la tolerancia periférica pueden ser debidos a (i) anergia, (ii) desviación inmunitaria, (iii) muerte celular (apoptosis) inducida por activación, u otros mecanismos desconocidos en la actualidad. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que linfocitos T reguladores median en la tolerancia periférica en al menos algunos modelos de enfermedades inmunológicas tales como colitis, rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas y enfermedades autoinmunitarias. La familia de células T reguladoras es diversa. Todas ellas son anérgicas, es decir, no proliferan en respuesta a un antígeno, y son tolerógenas, es decir, suprimen la actividad de las células T inmunógenas. En condiciones no patogénicas las Treg proceden del timo, suprimen las células Th inmunógenas por medio de un mecanismo que depende de contacto celular y son importantes para prevenir la autoinmunidad. Las células Tr1 se caracterizan por la producción de IL-10 y se ha puesto de manifiesto que suprimen las respuestas tanto de Th1 como de Th2, evitando con ello el desarrollo de autoinmunidad y enfermedades alérgicas. Las células Th3 están caracterizadas por la producción de TGF β y se ha indicado que están involucradas en la tolerancia oral.

20 El mecanismo por el que las APCs, en particular las DC, inducen el desarrollo de células T reguladoras, es desconocido en gran medida. Aunque las DC están implicadas en la generación de estas formas de tolerancia periférica, se desconoce actualmente si son un subconjunto diferente o son generadas fuera de DC inmaduras por factores microambientales (desconocidos). Las DC que generan células Tr1 han sido caracterizadas por la producción de IL-10 mientras que las DC que generan células Th3 han sido caracterizadas por la producción de TGF β . Células T reguladoras, específicas de antígenos, que producen IL-10 y/o células T anérgicas, pueden ser generadas también por estimulación repetitiva con DC inmaduras que presentan antígeno (Dhodapkar et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Roncarolo et al., 2001). Experimentos in vitro sugieren que la supresión por las células T reguladoras inducidas por DC parcialmente maduras, depende del contacto celular (Jonuleit et al., 2001).

Vacunación con alérgeno.

25 Aunque la vacunación con alérgeno ha sido practicada desde 1911, recientes desarrollos en la purificación de extractos y en la comprensión del mecanismo, ha aumentado su aplicabilidad en la actualidad y su promesa para el futuro del tratamiento de enfermedades alérgicas. La inyección subcutánea con dosis crecientes de alérgenos conduce en la mayoría de los pacientes alérgicos a la disminución de la inflamación inducida por alérgenos, a una disminución importante de los síntomas alérgicos y del requerimiento de medicación, y a la mejoría de la función pulmonar, como ha sido resumido en un meta-análisis. Los efectos clínicos y antiinflamatorios (piel, conjuntivas) permanecen incluso años después de detener el programa de vacunación.

30 Aunque esta forma clásica de vacunación con alérgeno es claramente beneficiosa para el tratamiento de pacientes con asma monoalérgico, rara vez da por resultado el alivio completo de todos los síntomas. Además, la ocurrencia de efectos secundarios a dosis altas, especialmente en el asma, la aplicación engorrosa de inyecciones repetitivas durante períodos de tiempo largos y los fuertes efectos clínicos de terapias concurrentes tales como la inhalación de corticosteroides, desaniman a los médicos a usarla a gran escala. Por tanto, existe una gran necesidad de nuevas estrategias que mejoren la vacunación con alérgeno y reduzcan los efectos secundarios indeseados.

35 Mecanismos de vacunación con alérgeno de pacientes alérgicos

El efecto clínico de la vacunación con alérgeno (llamada también inmunoterapia específica de alérgeno o inmunoterapia) es probable que sea mediado a través de la reducción de la inflamación inducida por el alérgeno. El proceso inmunológico que subyace en este efecto permanece desconocido actualmente. Dado que las células T

regulan la respuesta inflamatoria, se ha enfocado mucho esfuerzo sobre la activación y diferenciación de linfocitos T con respecto a la vacunación con alérgeno. Han sido propuestas tanto la hipo-reactividad específica del alérgeno, como un cambio en el perfil de citoquinas de los linfocitos T reaccionantes (Th2 a Th1). Esto ha abierto la posibilidad de mejorar la eficacia de la vacunación con alérgeno mediante citoquinas inmunorreguladoras tales como IL-12 ó IL-18. Recientemente, ha sido demostrado el papel potencial de IL-10 en el efecto beneficioso de la vacunación con alérgeno en pacientes alérgicos por veneno de abeja. Durante la inmunoterapia con veneno de abeja, la reducción de la proliferación de células T y las respuestas de las citoquinas (IL-5, IL-13) por reestimulación in vitro pudieron ser antagonizadas completamente por neutralización de la IL-10. Estos resultados sugieren que las células T reguladoras (Tr1) que producen IL-10 desempeñan un papel importante en la vacunación con alérgeno. Se ha indicado que la IL-10 hace disminuir la producción de IgE y que intensifica la producción de IgG4 en linfocitos B humanos in vitro. Al nivel de las células T, la IL-10 reduce las respuestas de las células T a antígenos específicos mediante la supresión de señales coestimulantes (B7-1 y B7-2) comunicadas por células que presentan antígeno.

Modelo preclínico de asma alérgico en el ratón

Anteriormente, los inventores habían desarrollado un modelo altamente reproducible en el ratón (BALB/c) con características inmunológicas y patofisiológicas recordativas del asma alérgico, p.ej. IgE específica de antígeno, inflamación eosinofílica de las vías respiratorias e hiper-respuesta de las vías respiratorias a la metacolina. Estas características del asma están asociadas con la aparición de células Th2 en el tejido pulmonar y con la desecación de los nódulos linfáticos. Dichas células Th2 y las citoquinas que ellas producen, desempeñan un papel fundamental en la iniciación y progresión de las manifestaciones del asma de las vías respiratorias como ha sido puesto de manifiesto por estudios realizados utilizando anticuerpos monoclonales para las citoquinas y por agotamiento o transferencia de subconjuntos de células T.

Vacunación con alérgeno en un modelo de ratón

Los inventores han sido los primeros en demostrar que la vacunación con alérgeno es eficaz en un modelo de ratón de asma alérgica. Un protocolo de inyecciones subcutáneas de alérgeno que se asemeja a un protocolo semiactivo utilizado en seres humanos, fue eficaz para prevenir la hiper-reactividad de las vías respiratorias inducida con alérgeno, a la metacolina y la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias. Durante la vacunación con alérgeno, tuvo lugar una elevación inicial de los niveles de IgE sérica, después de lo cual los niveles de IgE decrecieron acusadamente al mismo tiempo que un aumento de los niveles de IgG2a. El aumento de anticuerpos IgG2a indica un papel para el IFN γ producido o bien por células Th1 o por células Tr1. La regulación a la baja de estas manifestaciones de asma de las vías respiratorias estaba asociada con la disminución de la producción de citoquinas del tipo Th2 (IL-4 e IL-5) por reestimulación in vitro. Estos resultados sugieren que el efecto beneficioso de la vacunación con alérgeno está mediado por un efecto sobre los linfocitos de Th2 tal como (i) anergia, (ii) inducción de células Th1 ó Th3/Tr1 ("desviación inmunitaria"), (iii) muerte celular (apoptosis) inducida por activación u otros mecanismos desconocidos actualmente.

35 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona composiciones para usar en métodos de tratamiento de patologías alérgicas según se define en las reivindicaciones anejas. Los métodos comprenden administrar compuestos de di-hidroxivitamina D3 junto con la administración de un alérgeno. Dichos compuestos hacen disminuir la actividad de APCs de tal modo que la APC manipula todavía el antígeno y expone a los linfocitos los epítopos situados sobre su superficie, pero la producción de moléculas coestimulantes disminuye o se evita. Por tanto, la presente invención ilustra un método para inducir y/o aumentar en un sujeto la tolerancia a un alérgeno, que comprende inhibir y/o prevenir la producción de una molécula coestimulante en una célula que presenta antígeno, en presencia de un alérgeno.

El alérgeno es administrado a una persona necesitada de tal inducción o intensificación de tolerancia. Debido a que las moléculas coestimulantes son expresadas después del desencadenamiento de los caminos de transducción de señales del NF- κ B y/o el del MAPK/AP-1, es un objeto de la presente invención inhibir dichos caminos en APCs. Los inhibidores pueden ser incorporados en una composición farmacéutica con un diluyente adecuado. Dicho diluyente puede ser cualquier fluido aceptable para inoculación intravenosa o parenteral. En una realización el diluyente adecuado puede comprender agua y/o aceite y/o una sustancia grasa. Dichos compuestos de di-hidroxivitamina D3 son combinados con uno o más alérgenos. Por consiguiente, la presente invención ilustra una composición farmacéutica que comprende compuestos de di-hidroxivitamina D3 y uno o más alérgenos, y que comprende, además, un diluyente adecuado. Dichos compuestos de di-hidroxivitamina D3 pueden ser administrados a un paciente necesitado de tal tratamiento antes de la administración de los alérgenos. Los compuestos de di-hidroxivitamina D3 pueden ser administrados por otra vía que la de dichos alérgenos. Por ejemplo, los compuestos de di-hidroxivitamina D3 pueden ser proporcionados por vía oral o por vía tópica, seguida de la administración por vía tópica de los alérgenos. Dicha administración tópica comprende la administración sobre la piel, y/o sobre la mucosa de las vías respiratorias y/o de la cavidad buconasal, y/o de la mucosa gastrointestinal.

En otra realización dichos compuestos de di-hidroxivitamina D3 pueden ser combinados con dichos alérgenos antes de administrar a un paciente. Por tanto, la presente invención describe también una composición farmacéutica según

se ha mencionado anteriormente, en donde dichos compuestos de di-hidroxitamina D3 se combinan con dicho alérgeno antes de administrar a un paciente.

- La administración de las composiciones farmacéuticas mencionadas aumenta la inducción de tolerancia a alérgenos y puede hacer disminuir los síntomas de enfermedades en pacientes aquejados de hipersensibilidad a diversos alérgenos. Por consiguiente, se describe un método para aumentar la inducción de inmunotolerancia, que comprende proporcionar una composición farmacéutica según se ha mencionado anteriormente, por administración oral, y/o enteral, y/o intranasal, y/o dérmica.

Inhibición del camino de transducción de señales de NF- κ B

- La familia de factores de transcripción NF- κ B desempeña un papel fundamental en la coordinación de la expresión de una amplia variedad de genes que regulan respuestas inmunitarias e inflamatorias, que incluyen citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión de células, moléculas coestimulantes, factores de complemento y factores antiapoptóticos (McKay et al, 1999). Los miembros de la familia NF- κ B de mamíferos incluyen Re1A (p65), NF- κ B1 (p50; p150), NF- κ B2 (p52; p100), cRe1 y Re1B. Importantemente, experimentos con ratones con supresión génica han demostrado que los NF- κ B1 p50, Re1A y cRe1 son esenciales en la función inmunitaria innata de las DC, Proteínas de NF- κ B están presentes en el citoplasma en asociación con proteínas inhibitoras que son conocidas como inhibidores de NF- κ B (I κ Bs). La familia de proteínas I κ B consiste en I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ y BCL-3 (Li, NRDD). Una etapa esencial en la activación de células inmunitarias innatas por patógenos, moléculas de estrés y citoquinas proinflamatorias, es la degradación de I κ B y la liberación de NF- κ B y su fosforilación subsiguiente que permite a las proteínas de NF- κ B translocarse a los núcleos y unirse a sus sitios de unión de DNA afines para regular la transcripción de gran número de genes. Una etapa reguladora crucial en la degradación de I κ Bs es la fosforilación de I κ B inducida por señales, en restos específicos de serina del extremo amino terminal, que es mediada por I κ B quinasas (IKK) específicas de serina. El I κ B fosforilado en el resto de serina es ubiquitinilado después y degradado por proteasoma. El complejo de IKK consiste en varias proteínas, siendo las principales IKK1 (IKK γ), IKK2 y el modulador esencial de la subunidad reguladora de NF- κ B (NEMO, conocido también como IKK ζ).
- La inhibición de la activación de NF- κ B puede conseguirse mediante diversas estrategias que incluyen, pero no se limitan a la elección directa como diana de la actividad de unión de DNA de proteínas individuales de NF- κ B usando moléculas pequeñas u oligonucleótidos reclamo; tratamiento con proteínas mutantes I κ B α , - β ó - ϵ que no se degradan, permeables a la membrana celular; bloqueo de la translocación nuclear de dímeros de NF- κ B por inhibición del sistema de significación nuclear; estabilización de proteínas I κ B α , - β o - ϵ por desarrollo de ubiquitinilación e inhibidores de proteasoma; y elección como diana de quinasas de señalización tales como IKK usando inhibidores de moléculas pequeñas (Li et al., 2002); tratamiento con proteína IKK dominante, negativa, permeable a la membrana celular. Diversos fármacos que se usan para tratar enfermedades inflamatorias tienen efectos sobre la actividad de NF- κ B tales como los glucocorticosteroides (GCS), la aspirina y otros medicamentos antiinflamatorios. Aun cuando estos fármacos no eligen como diana, específicamente, a NF- κ B, parte de sus efectos farmacológicos son debidos a inhibición de la actividad de NF- κ B. Además de estos fármacos, figuran descritos en la bibliografía muchos compuestos como inhibidores de la activación de NF- κ B, tales como, por ejemplo, antioxidantes, inhibidores de proteasoma y proteasa, inhibidores de la fosforilación y/o degradación de I κ B e inhibidores diversos (tabla 1)

Inhibición del camino de transducción de señales de MAPK/AP-1

- Los mamíferos expresan al menos cuatro grupos regulados distintamente, de proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), ERK-1/2, ERK5, JNK1/2/3 y p38 α / β / γ / δ , que se ha indicado que regulan diversos fenómenos celulares fisiológicos y patológicos, que incluyen inflamación, muerte celular apoptótica, transformación oncogénica, invasión de células tumorales y metástasis; Herlaar et al., 1999). Por estimulación celular se inicia una cascada de quinasas que en último lugar conduce a una expresión génica alterada y, por consiguiente, a una respuesta biológica. Las tres quinasas principales de las cascadas de MAPK son la MAPK quinasa quinasa (MKKK), la MAPKK quinasa (MKK) y la MAPK. En total, han sido identificadas 12 isoformas de MAPK que pueden fosforilar y activar un gran número de sustratos, que incluyen factores de transcripción y quinasas. Las p38MAPK y JNK son proteína quinasas activadas por estrés que median respuestas a factores celulares de estrés tales como luz UV y estrés oxidativo. Una amplia variedad de mediadores inflamatorios, tales como las citoquinas, activan a la p38MAPK en células inmunitarias e inflamatorias. Hasta la fecha, han sido desarrollados varios inhibidores específicos de MAPK, que, en particular, hacen diana en p38 MAPK. Se ha demostrado que los compuestos de piridinilimidazol, puestos de ejemplo por SB 203580, son inhibidores selectivos de p38 MAPK. Este compuesto inhibe específicamente la p38 α , β y la β 2 MAPK, y ha mostrado actividad en una diversidad de modelos animales de inflamación aguda y crónica. Otros compuestos de moléculas pequeñas que inhiben la p38 MAPK son el VX-746 (Vertex Pharmaceuticals), el RWJ67657 (Johnson and Johnson) y el HEP 689 (Leo Pharmaceuticals). Interesantemente, se ha indicado que el compuesto SB 203580 inhibe la maduración de células dendríticas. Otros compuestos que han puesto de manifiesto que inhiben la maduración de células dendríticas por medio de la inhibición de p38 MAPK son la partenolida lactónica sesquiterpénica antiinflamatoria (PTL) y la citoquinas IL-10. Por contraste, se ha indicado

que la inhibición del camino de MAPK ERK por los inhibidores selectivos PD98059 y U0126, intensifica la maduración fenotípica y funcional de las células dendríticas.

Poco se conoce acerca del papel de JNK MAPK en la regulación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Se ha expuesto que el inhibidor de JNK SP600152 inhibe la inducción de la producción de IL-18 por macrófagos y la señalización del T1/ST2, un receptor de la membrana celular que es expresado selectivamente en linfocitos Th2.

- 5
- Las MAPKs son reguladores aguas arriba de AP-1. La proteína activadora 1 (AP-1) de la familia de factores de transcripción, está formada por complejos heterodiméricos de una proteína Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB y FosB2) con una proteína Jun (c-Jun, JunB y JunD), o un homodímero entre dos proteínas Jun (Foletta et al., 1998). La proteína AP-1 regula al alza muchos de los genes regulados durante las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Los represores mejor conocidos del factor de transcripción AP-1 son los glucocorticoides. Junto con la activación de la inhibición de NF- κ B por glucocorticoides, esos son los mecanismos principales de los efectos antiinflamatorios de esta clase de fármacos (McKay et al., 1999). La activación de la transcripción génica por la AP-1 puede ser inhibida también por oligonucleótidos reclamo.
- 10

Inhibición indirecta de los caminos de transducción de señales de NF- κ B y MAPK/AP-1

- 15
- La activación de los caminos de NF- κ B y/o MAPK/AP-1 también puede evitarse por interferencia con moléculas de "coestimulación" o mediadores de activación producidos localmente por (i) bloqueo de los mediadores de activación de NF- κ B y/o MAPK/AP-1, que incluyen, pero no se limitan a citoquinas tales como IL-1, -2, -12, -15, -17, -18, LIF, y miembros de la superfamilia del TNF tales como el ligando FAS, el ligando GITR, el ligando THANK RANK (denominado también TRANCE u OPGL), TNF α y TNF β , o bloqueo de sus receptores específicos de la membrana celular, o (ii) bloqueo de PRR que incluyen, pero no se limitan a receptores "toll-like" receptores de lectinas o NODs, o (iii) prevención del estrés oxidativo usando antioxidantes, o (iv) bloqueo de proteínas de choque térmico extracelulares o sus receptores de la membrana celular, o (v) bloqueo de receptores purinérgicos, en particular los expresados en APCs.
- 20

- La activación de NF- κ B, en particular en APCs, puede ser inhibida, asimismo, por compuestos que aumentan los niveles intracelulares de AMP cíclica, que incluyen, pero no se limitan a agonistas de receptores adrenérgicos de tipo β 2, agonistas de receptores prostanoideos EP-2 ó DP o inhibidores de fosfodiesterasa IV.
- 25

Inhibición de los caminos de transducción de señales de NF- κ B y MAPK/AP-1 por activación de PPAR

- Recientemente, ha surgido una familia interesante de receptores nucleares de hormonas, llamados receptores activados por proliferador de peroxisoma (PPARs) que por ligación ejercen efectos inhibidores potentes sobre los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Daynes et al., 2002; Hihi et al., 2002). Hasta ahora, han sido identificadas tres isoformas de PPAR, PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ con un alto grado de homología estructural y de secuencias. Los PPARs comparten la propiedad de formar heterodímeros con otro receptor nuclear del mismo subgrupo, el receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR), que al parecer es esencial para su función biológica. Diversos tipos de ácidos grasos y de eicosanoides pueden unirse a los PPARs y activarlos, con algún grado de especificidad de isoforma. (Daynes et al., 2002; Hihi et al., 2002). El PPAR α puede ser activado por los ácidos α -linoleico, γ -linoleico, araquidónico y eicosapentaenoico, y por ácidos grasos saturados y monoinsaturados de cadena media tales como el ácido palmítico y el ácido oleico. El PPAR α puede ser activado selectivamente por LTB4 y 8(S)HETE. El PPAR γ es activado por los ácidos α -linoleico, γ -linoleico, araquidónico y eicosapentaenoico, aun cuando estos ligandos endógenos son activadores débiles. El PPAR γ es estimulado del mejor modo por los compuestos 9-HODE, 13-HODE y 15dPGJ2 y por el compuesto sintético rosiglitazona y la clase de fármacos de tiazolidinodiona. El PPAR β/δ puede ser activado por algunos ácidos grasos saturados, monoinsaturados e insaturados, y por diversos eicosanoides que incluyen el PGA1 y el PGD2, y por prostaciclina o una forma sintética estable. Interesantemente, el PPAR α y el PPAR γ son expresados en células que presentan antígeno (monocitos, macrófagos, células dendríticas y células B) y pueden desempeñar un papel importante en la regulación a la baja de la actividad de NF- κ B y AP-1 (Daynes et al., 2002; Nencioni et al., 2002).
- 30
- 35
- 40
- 45

Vacunación con DNA

- La vacuna estándar de DNA consiste en un gen o genes específicos de interés clonados en un plásmido bacteriano construido para obtener una expresión óptima en células eucarióticas. Las características esenciales incluyen un promotor potente para una expresión óptima en células de mamífero, un origen de replicación que permite el crecimiento en bacterias, un gen bacteriano de resistencia a antibióticos y la incorporación de secuencias de poliadenilación para estabilizar los transcritos de mRNA. Además, las vacunas de DNA contienen también secuencias de nucleótidos específicas que desempeñan un papel crítico en la inmunogenicidad de estas vacunas. En el caso de vacunación con alérgeno usando vacunas de DNA, el plásmido contiene secuencias de nucleótidos que codifican uno o más alérgenos o fragmentos de alérgenos, que contienen al menos una secuencia del epítipo de células T. Los alérgenos para usar en la invención incluyen, pero no se limitan a la lista disponible en la World-Wide Web en <http://www.allergen-org/List-htm>. Se ha indicado que las respuestas inmunitarias inducidas por la vacunación con DNA están mediadas por APCs, en particular DCs que emigran desde el lugar de vacunación hasta
- 50
- 55

los nódulos linfáticos de drenaje. Las DCs o bien son transferidas directamente o bien fijan proteínas secretadas procedentes de otras células transfectadas, a saber, monocitos. La fusión del alérgeno o fragmento de alérgeno con un fragmento Fc de IgG, mejora la secreción del alérgeno que codifica y la subsiguiente elección como diana, y la captación por APCs. La elección como diana por las vacunas de DNA de APCs, en particular DCs, puede ser obtenida usando vectores virales particulares que incluyen, pero no se limitan a herpesvirus, virus vacunal, adenovirus, influenza virus, retrovirus y lentivirus (Jenne et al., 2001). Vacunas de DNA de segunda generación están siendo desarrolladas también, cuyas vacunas introducen no solamente un gen que codifica el antígeno diana, sino también un gen que codifica algún otro factor capaz de inducir una respuesta inmunitaria alterada. Dentro de la presente invención, el plásmido que comprende un epítipo de células T puede ser combinado con genes que codifican proteínas que inhiben la activación del camino de NF- κ B, que incluyen, pero no se limitan a proteínas I κ B (que no se degradan) o a formas negativas dominantes de proteínas IKK o proteínas NF- κ B y/o genes que codifican proteínas que inhiben la activación del camino de MAPK/AP-1, que incluyen, pero no se limitan a formas negativas dominantes de proteínas críticas que conducen a la activación de proteínas Fos y/o Jun tales como la p38 MAPK o formas negativas dominantes de proteínas Fos y/o Jun. En otra realización, el plásmido que comprende un epítipo de células T puede ser combinado con secuencias pequeñas de RNA que interfieren o con secuencias antisentido que inhiben la expresión de proteínas IKK, NF- κ B, p38 MAPK o AP-1.

Naturalmente, los efectos de inhibir o prevenir la producción de una molécula coestimulante en una célula que presenta antígeno, cuando dicha célula que presenta antígeno se pone en contacto con un alérgeno, también pueden estudiarse y apreciarse sobre células aisladas, in vitro. Los efectos de un compuesto sobre la producción de una molécula coestimulante puede ensayarse, por tanto, in vitro y puede hacerse una selección en cuanto a qué compuesto es el más adecuado para inhibir la producción de una molécula coestimulante por una célula que presenta antígeno. Por consiguiente, se describe un método para inhibir y/o prevenir la producción de una molécula coestimulante en una célula que presenta antígeno, en presencia de un alérgeno, en donde dicha producción de una molécula coestimulante es inhibida y/o prevenida mediante la inhibición de los caminos de transducción de señales de NF- κ B y/o MAPK/AP-1 en dicha célula que presenta antígeno

Nuevas estrategias de vacunación con alérgeno

En el documento más reciente sobre la posición de la Organización Mundial de la Salud, se define la vacunación o inmunoterapia con alérgeno como la práctica de administrar gradualmente a un paciente alérgico, cantidades crecientes de un extracto de alérgeno para mejorar los síntomas asociados con la exposición subsiguiente al alérgeno causativo (Bousquet et al., 1998). En la presente invención, se describen nuevas formas de vacunación con alérgeno que presentan ventajas importantes sobre la práctica actual de la inmunoterapia con alérgeno.

Los alérgenos para usar en la invención incluyen, pero no se limitan a la lista disponible en la World-Wide Web en <http://www.allergen.org/List.htm>.

El alérgeno utilizado puede ser un extracto de un alérgeno tal como los ácaros del polvo doméstico o el polen o sus fragmentos, que contiene al menos un epítipo de células T o una proteína alérgica recombinante total o parcial tal como la Der p1 que contiene al menos un epítipo de células T. La vía de administración preferida es la inyección subcutánea; sin embargo, también pueden ser eficaces otras vías tales como la de la aplicación nasal, oral o sublingual. Otra realización es el uso de vacuna de DNA que incorporan un gen que codifica la secuencia alérgica total o parcial y que contiene al menos una secuencia de un epítipo de células T (Walker et al., 2001).

El curso de una vacunación con alérgeno lleva consigo, habitualmente, una fase de fortalecimiento (dosis crecientes de alérgeno) y una fase de mantenimiento (dosificación máxima del alérgeno), en la que el alérgeno es administrado con un intervalo de 1-2 meses. La duración de la vacunación con alérgeno que se requiere para mantener la mejoría de los síntomas clínicos ha sido aconsejada a 3 a 5 años de terapia (Bousquet et al., 1998). La vacunación con alérgeno se inicia rara vez antes de la edad de 5 años. Cuando se comienza a intervenir pronto en el proceso de la enfermedad, la vacunación con alérgeno puede modificar la progresión de la enfermedad.

Las nuevas estrategias de vacunación con alérgeno consisten en el tratamiento con compuestos de di-hidroxivitamina D3 en el momento de la inyección de alérgeno. Estos compuestos pueden ser inyectados conjuntamente por vía subcutánea junto con el alérgeno, o aplicados por separado por administración sistémica (par)enteral.

Los métodos proporcionados en la presente memoria son adecuados para tratar cualesquiera patologías alérgicas que incluyen, pero no se limitan a rinitis, alergia alimentaria, urticaria, dermatitis atópica y asma.

Tabla 1. Lista no exhaustiva de inhibidores de activación de NF- κ B según se describe en la bibliografía, agrupados como antioxidantes, inhibidores de proteasoma y proteasa, inhibidores de la fosforilación y/o degradación de I κ B α e inhibidores diversos (modificada a partir de <http://people-bu.edu/gilmore/nf-kb>).

| Antioxidantes | Inhibidores de proteasoma y/o proteasa | Inhibidores de la fosforilación y/o degradación de I κ B α | Inhibidores diversos |
|--|--|---|---|
| Acido α -lipoico | ALLnL (N-acetil-leucinil-leucinil-norleucinal, MG101) | Rocaglamidas (Derivados de Aglaia) | Proteína β -amiloidea |
| α -Tocoferol | Z-LLnV (carbобензоxil-leucinil-leucinil-norvalinal, MG 115) | Dímero de jesterona | Glucocorticoides |
| Extracto de ajo envejecido | Z-LLL (carbобензоxil-leucinil-leucinil-leucinal, MG 132) | Silibinina | IL-10 |
| Anetolditioliona (ADT) | Lactacistina, β -lactona | Quercetina | IL-13 |
| Hidroxianisol butilado (BHA) | Acido borónico Péptido | Estaurosporina | IL-11 |
| Cefarantina | Inhibidores de Ubiquitina Ligasa | Aspirina, salicilato sódico | Dioxina |
| Ester fenetílico del ácido caféico (ácido 3,4-dihidroxicinámico, CAPE) | PS-341 | BAY-117821 (E3((4-metilfenil)sulfonil)-2-propenonitrilo) | Leptomicina B (LMB) |
| Derivados de catecol | Ciclosporina A | BAY-117083 (ES((4-t-butilfenil)sulfonil)-2-propenonitrilo) | péptidos permeables de células NLS |
| Dibencilbutirolactona, lignanos | FK506 (Tacrolimus) | Cicloepoxidón; 1-hidroxi-2-hidroximetil-3-pent-1-etilbenceno | o,o'-bismiristoil tiamina, disulfuro (BMT) |
| Dietilditiocarbamato (DDC) | Desoxiespergualina | Lipoproteína de baja densidad oxidada extensamente (ox-LDL) 4-Hidroxinonenal (HNE) | Inhibidores de ribosilacion de ADP (nicotinamida, 3-aminobenzamida) |
| Diferoxamina | APNE (N-acetil-DL-fenilalanina-b-naftiléster) | Ibuprofeno | Péptido natriurético atrial (ANP) |
| Ácido dihidrolipoico | BTEE (N-benzoil-L-tirosina-étil éster) | óxido nítrico (NO) | Atrovastat (Inhibidor de HMG-CoA reductasa) |
| Disulfiram | DCIC (3,4-dicloroisocumarina) | Prostaglandina A1 | Proteína AvrA (Salmonela) |
| Dimetilditiocarbamatos (DMDTC) | DFP (Fluorofosfato de diisopropilo) | Sulfasalizina | Albúmina de suero bovino |
| Curcumina (Diferuloilmetano) | TPCK (N-a-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) | YopJ (codificada por Yersinia pseudotuberculosis) | Calcitrol (1 α ,25-dihidroxivitamina D3) o análogos |
| Ebselén | TLCK (N-a-tosil-L-lisina clorometil cetona) | Hormona estimulante de los melanocitos-A (α -MSH) | Capsiato |
| EPC-K1 (Compuesto fosfodiéster de Vitamina E y vitamina C) | Inhibidores de la fosfodiesterasa, a saber, teofilina; pentoxifilina | Aucubina | Catalpósido |
| Epigalocatequina-3-galato (EGCG; polifenoles del té verde) | | β -lapacona | Claritromicina |
| Ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) | | Capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) | Diamida |

| Antioxidantes | Inhibidores de proteasoma y/o proteasa | Inhibidores de la fosforilación y/o degradación de I κ B α | Inhibidores diversos |
|---|--|--|---|
| Gamma-glutamilcisteína sintetasa (gamma-GCS) | | Proteína de núcleo del virus de la hepatitis C (HCV) | E3330 (derivado quinónico) |
| Glutación | | Diamida (Inhibidor de la tirosina fosfatasa) | Epoxiquinol A (metabolito fúngico) |
| IRFI 042 | | E-73 (análogo de la cicloheximida) | Glicirricina |
| Hierro tetrakis | | Emodín (3-metil-1,6,8-trihidroxiantraquinona) | Hemateína (compuesto vegetal) |
| L-cisteína | | Erbatán (Inhibidor de la tirosina quinasa) | Herbimicina A |
| Lacidipina | | Estrógeno (E2) | Hipericina |
| Magnolol | | Gliotoxina fúngica | Hidroquinona (HQ) |
| Superóxido manganeso dismutasa (Mn-SOD) | | Genisteína (Inhibidor de la tirosina quinasa) | IL-4 |
| Melatonina | | IL-13 | Proteínas semejantes a I κ B (codificadas por ASFV) |
| N-acetil-L-cisteína (NAC) | | Metabolito de leflunomida (A77 1726) | Kamebakaurina |
| Ácido nordihidroguaiarítico (NDGA) | | Proteína de la neurofibromatosis-2 (NF-2) | KT-90 (derivado sintético de morfina) |
| Orto-fenantrolina | | Pervanadato (Inhibidor de la tirosina fosfatasa) | Metales (cromo, cadmio, oro, plomo, mercurio, cinc, arsénico) |
| óxido de fenilarsina (inhibidor de la tirosina fosfatasa, PAO) | | óxido de fenilarsina (inhibidor de la tirosina fosfatasa, PAO) | Mevinolina 5'-metiltioadenosina (MTA) |
| Pirrolidinaditiocarbamato (PDTC) | | Polipéptido que activa la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) | N-etilmaleimida (NEM) |
| Quercetina | | Resiniferatoxina | Nicotina |
| Vino tinto | | Lactonas sesquiterpénicas (partenolida) | 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-beta-D-glucosa |
| Rotenona | | Tiopental | Pentoxifilina (1-(5'-oxohexil)-3,7-dimetilxantina, PTX) |
| S-alil-cisteína (compuesto aliáceo, SAC) | | Lipoproteínas ricas en triglicéridos | Fenil-N-terc-butilnitrona (PBN) |
| Tepoxalina (5-(4-clorofenil)-N-hidroxi-(4-metoxifenil)-N-metil-1H-pirazolo-3-propanamida) | | Péptido intestinal vasoactivo | Piritiona |
| Vitamina C | | Proteína Vpu de HIV-1 | Rolipram |
| Derivados de la Vitamina E | | Lignanós de dibencilbutirolactona | Quinadrilo (Inhibidor de ACE) |
| Succinato de α -torfrilo | | Ácido aurintricarboxílico | Ribavirina |
| Acetato de α -torfrilo | | BAY 11-7082 | Inhibidor de la leucocito proteasa secretora (SLPI) |

| Antioxidantes | Inhibidores de proteasoma y/o proteasa | Inhibidores de la fosforilación y/o degradación de I κ B α | Inhibidores diversos |
|--|--|--|---|
| PMC (2,2,5,7,8-pentametil-6-hidroxicromano) | | BAY 11-7085 | Derivado de serotonina (N-(p-cumaroil)serotonina,) (SC) |
| Carnosol | | Péptido de IKK-NBD | Silimarina |
| Selenita sódica Mol 294 | | Piceatannol | Sulfasalazina |
| | | | Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) |
| | | | D609 (Inhibidor de la fosfatidilcolina-fosfolipasa C) |
| | | | 2-[(3-metil-2,5-dioxo(3-pirrolinil)amino]-4-(trifluorometil)pirimidina-5-carboxilato de etilo |
| | | | Hidrocloruro de cicloprodiosina |
| | | | RO31-8220 (Inhibidor de PKC) |
| | | | SB203580 Inhibidor de p38 MAPK) |
| | | | Tranilast Acido [N-(3,4-dimetoxicinamoil)antranílico] |
| | | | Triptolida (PG490, extracto de hierba china) |
| | | | LY294.002 |
| | | | Mesalamina |
| | | | Qingkailing y Shuanghuanglian (Preparaciones medicinales chinas) |
| | | | Tetratiomolibdato |
| | | | Inhibidores del intercambio Na ⁺ /H ⁺ , a saber, amilorida |
| | | | Gliotoxina |
| | | | Estriol |
| | | | Wortmannin (Metabolito fúngico) |
| | | | Inductores de proteínas de choque térmico, a saber, curcumina |
| | | | Helenalina |

La invención es explicada, además, con mayor detalle en la descripción que sigue, que no es restrictiva de la invención.

Parte experimental

5 Materiales y métodos

Animales. El cuidado y empleo de los animales se llevó a cabo de conformidad con las pautas del Dutch Committee of Animal Experiments. Ratones BALB/c machos, exentos de patógenos, de 5-6 semanas de edad, fueron adquiridos de Charles River (Maastricht, Holanda), estabulados en jaulas de macrolón en una cabina de flujo laminar y provistos de alimento y agua ad libitum.

- 10 Sensibilización, tratamiento y enfrentamiento. Ratones de 6-8 semanas de edad fueron sensibilizados por vía intraperitoneal (i.p.) los días 0 y 7 con 10 μ g de ovoalbúmina (OVA, calidad V, Sigma-Aldrich) en el seno de 0,1 ml de alumbre (Pierce, Rockford, Illinois). Dos semanas después de la última sensibilización, los ratones fueron divididos en seis grupo. Los grupos de inmunoterapia simulada (sham-IT) y de inmunoterapia con OVA (OVA-IT)

fueron tratados respectivamente con 3 inyecciones por vía s.c., de 0,2 ml de solución salina exenta de pirógenos (B. Braun, Melsungen, Alemania) ó 1 mg de OVA en el seno de 0,2 ml de solución salina exenta de pirógenos, en días alternos. En tres grupos, la inmunoterapia con OVA fue inyectada conjuntamente con 0,1 µg, 0,03 µg ó 0,01 µg de 1 α ,25-dihidroxivitamina D3 (1 α ,25(OH)₂ VitD3), un inhibidor selectivo de NF- κ b. Un grupo fue tratado con
 5 inmunoterapia simulada y combinado con la inyección conjunta de 0,1 µg de 1 α ,25(OH)₂ VitD3. Diez días después del tratamiento, los ratones fueron expuestos a tres enfrentamientos de inhalación de OVA (10 mg/ml en solución salina) durante 20 minutos cada tercer día.

En una segunda serie de experimentos, la inmunoterapia con OVA, según se ha descrito anteriormente, se llevó a cabo usando una cantidad subóptima de 100 µg de OVA en el seno de solución salina para realizar la inmunoterapia
 10 con OVA. La inmunoterapia con OVA fue administrada o bien sola o bien en combinación con 0,01 µg de 1 α ,25(OH)₂ VitD3. La inmunoterapia simulada, sola o combinada con 0,01 µg de 1 α ,25(OH)₂ VitD3, sirvió como grupos testigo.

Medida del grado de respuesta de las vías respiratorias in vivo.

Se midió el grado de respuesta de las vías respiratorias a la metacolina después de tratamiento pero antes del
 15 enfrentamiento con OVA (medida preliminar) y veinticuatro horas después del último enfrentamiento con OVA. El grado de respuesta de las vías respiratorias se midió en ratones conscientes, sin inquietar, usando pletismografía barométrica de cuerpo total, mediante el registro de las curvas de la presión respiratoria (Buxco, EMKA Technologies, París, Francia) en respuesta a la metacolina (cloruro de acetil- β -metilcolina, Sigma-Aldrich) inhalada. El grado de respuesta de las vías respiratorias fue expresado en pausa intensificada (Penh), según se ha descrito
 20 con detalle anteriormente (Deurloo et al., 2001). Brevemente, los ratones fueron colocados en una cámara de cuerpo total y se realizaron lecturas basales durante 3 minutos. Solución salina en forma de aerosol, seguida de concentraciones dobles de metacolina (que variaban desde 3,13 a 25 mg/ml) en solución salina, fueron nebulizadas durante 3 minutos y se realizaron lecturas durante 3 minutos después de cada nebulización.

Determinación de niveles de IgE específica de OVA, en el suero

Desde cada ratón se obtuvo suero después del tratamiento pero antes del enfrentamiento con OVA (medida preliminar) mediante una pequeña incisión en la vena caudal. Después de medir el grado de respuesta de las vías respiratorias in vivo, los ratones fueron sacrificados por inyección i.p. de 1 ml de uretano al 10% en solución salina y desangrados mediante punción cardíaca. Seguidamente, se recogió el suero y se mantuvo a -70°C hasta su
 25 análisis. Los niveles séricos de IgE, específica de OVA, se midieron mediante el método ELISA en sandwich según se ha descrito anteriormente (Deurloo et al., 2001).
 30

Análisis de la composición celular del fluido de lavado broncoalveolar.

Se llevó a cabo un lavado broncoalveolar (BAL) inmediatamente después de desangrar los ratones, lavando las vías respiratorias a través de una cánula traqueal, 5 veces, con 1 ml de solución salina (37°C). Las células existentes en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS frío. El número total de
 35 células del BAL se determinó utilizando una cámara de recuento de Bürker-Türk (Karl Hecht Assistent KG, Sondheim/Röhm, Alemania). Para realizar recuentos diferenciales de células de BAL, se hicieron preparaciones de citospina (15 x g, 5 minutos, 4°C, Kendro Heraeus Instruments, Asheville, Carolina del Norte). Seguidamente, las células fueron fijadas y sometidas a tinción con Diff-Quick (Dade A.G., Düdingen, Suiza). Por citospina, se contaron 200 células y se diferenciaron en células mononucleares, eosinófilos, y neutrófilos por las características estándar de morfología y de tinción.
 40

Análisis estadístico. Todos los resultados son expresados como media \pm error típico de la media (SEM)

Las curvas de dosis-respuesta de las vías respiratorias a la metacolina fueron analizadas estadísticamente mediante un modelo lineal, general, de medidas repetidas, seguido de una comparación post-hoc entre grupos. Los resultados obtenidos fueron transformados en logaritmos antes de realizar su análisis para igualar las varianzas de todos los
 45 grupos. Todos los otros resultados obtenidos fueron analizados usando el ensayo de la t de Student (homosedástico, distribución de 2 colas). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos en el nivel $p < 0,05$.

Resultados 1

Grado de respuesta de las vías respiratorias in vivo

50 No se observaron diferencias significativas entre todos los seis grupos en cuanto al grado de respuesta a la metacolina después del tratamiento pero antes del enfrentamiento con OVA (figura 1A). Los ratones BALB/c sensibilizados con OVA que habían recibido inmunoterapia simulada, pusieron de manifiesto un hipergrado de respuesta de las vías respiratorias (AHR), importante, a la metacolina después del enfrentamiento de inhalación de OVA, en comparación con el de antes del enfrentamiento. Los ratones que habían recibido inmunoterapia con OVA pusieron de manifiesto un AHR a la metacolina, importante, después del enfrentamiento con OVA, en comparación
 55 con el de antes del enfrentamiento. Sin embargo, la inmunoterapia con OVA redujo parcialmente ($p < 0,05$) el AHR a

la metacolina en comparación con el de los ratones del tratamiento simulado. Interesantemente, la inyección conjunta de $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3, en todas las dosis utilizadas, con inmunoterapia con OVA, potenció significativamente la disminución del AHR a la metacolina comparado con la de la OVA-IT sola. La inyección conjunta de $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3 con la inmunoterapia simulada (sham-IT) no afectó al AHR. Puede llegarse a la conclusión de que la inyección conjunta del inhibidor selectivo de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, $1\alpha,25(\text{PH})_2$ VitD3, potencia el efecto supresor de la inmunoterapia con OVA sobre el AHR.

Niveles en el suero de IgE, específica de OVA.

Los ratones BALB/c que habían recibido inmunoterapia simulada pusieron de manifiesto un aumento importante de los niveles séricos de IgE, específica de OVA, después del enfrentamiento de inhalación de OVA, en comparación con los de antes del enfrentamiento (figura 2). En los ratones que habían recibido inmunoterapia con OVA, los niveles séricos de IgE, específica de OVA, habían disminuido de modo importante después del enfrentamiento con OVA en comparación con los de los ratones enfrentados con OVA tratados de modo simulado. La inyección conjunta de $0,01 \mu\text{g}$ de $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vit D3 con inmunoterapia con OVA, aumentó significativamente la disminución de los niveles séricos de IgE en comparación con los de la inmunoterapia con OVA sola. La inyección conjunta de $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3 con inmunoterapia simulada no afectó a los niveles séricos de IgE en comparación con los de la inmunoterapia simulada sola. Puede llegarse a la conclusión de que la inyección conjunta del inhibidor selectivo de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3, a $0,01 \mu\text{g}$, potencia la supresión de niveles séricos de IgE, específica de OVA, después de inmunoterapia con OVA.

Composición celular del fluido de lavado broncoalveolar (BALF)

En los ratones BALB/c no están presentes eosinófilos en el BALF antes de la inhalación de OVA. Los ratones BALB/c sensibilizados con OVA que habían recibido inmunoterapia simulada (sham-IT), pusieron de manifiesto eosinofilia del BALF después del enfrentamiento con inhalaciones de OVA (figura 3). Después del enfrentamiento con OVA de los ratones que habían recibido inmunoterapia con OVA, el número de eosinófilos del BALF había disminuido de modo importante en comparación con el de los ratones tratados de modo simulado. La inyección conjunta de $0,01 \mu\text{g}$ de $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vit D3 con inmunoterapia con OVA, aumentó significativamente la disminución del número de eosinófilos comparado con el de la inmunoterapia con OVA sola. La inyección conjunta de $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3 con inmunoterapia simulada, no afectó significativamente al número de eosinófilos del BAL. Puede deducirse que la inyección conjunta del inhibidor selectivo de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3, a $0,01 \mu\text{g}$, potencia la supresión de eosinofilia del BALF después de inmunoterapia con OVA.

Colectivamente, se llegó a la conclusión de que el inhibidor selectivo de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3, es capaz de potenciar el efecto beneficioso de la inmunoterapia con OVA sobre el hipergrado de respuesta de las vías respiratorias, los niveles séricos de IgE y la eosinofilia de las vías respiratorias, todos ellos síntomas importantes del asma.

Resultados 2

En los resultados anteriormente descritos, el efecto de la inyección conjunta del inhibidor selectivo de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3, con inmunoterapia con OVA, fue el más pronunciado con respecto a la potenciación de la supresión del AHR. La potenciación de la supresión de la eosinofilia del BALF fue menos pronunciada debido a que la cantidad de OVA utilizada para la inmunoterapia con OVA había inducido ya una fuerte supresión, casi la máxima, del número de eosinófilos del BALF (figura 3). Por consiguiente, se examinó el efecto de la inyección conjunta de $0,01 \mu\text{g}$ de $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3 con una cantidad subóptima de OVA ($100 \mu\text{g}$) para la inmunoterapia con OVA.

Composición celular del fluido de lavado broncoalveolar.

En ratones BALB/c, no están presentes eosinófilos en el BALF antes de la inhalación de OVA. Los ratones BALB/c sensibilizados con OVA, que habían recibido inmunoterapia simulada, manifestaron eosinofilia del BALF después del enfrentamiento con inhalaciones de OVA (figura 4). Después del enfrentamiento con OVA de los ratones que habían recibido inmunoterapia con OVA ($100 \mu\text{g}$), el número de eosinófilos del BALF había disminuido significativamente comparado con el de los ratones tratados de modo simulado. La inyección conjunta de $0,01 \mu\text{g}$ de $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3 con una dosis subóptima de inmunoterapia con OVA, aumentó de modo importante la disminución del número de eosinófilos del BALF comparado con el de la inmunoterapia con OVA sola. La inyección conjunta de $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3 con inmunoterapia simulada no afectó significativamente al número de eosinófilos del BAL.

Puede deducirse que la inyección conjunta del inhibidor selectivo de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3, con inmunoterapia con OVA subóptima, es capaz de potenciar la supresión del número de eosinófilos del BAL mediante una dosis de OVA subóptima. Además, la inyección conjunta del inhibidor selectivo de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3, puede reducir la cantidad de alérgeno (en este caso OVA) necesario para obtener un nivel particular de supresión mediante inmunoterapia con alérgeno.

Descripción de las figuras

Figura 1. Grado de respuesta de las vías respiratorias a la inhalación de dosis diferentes de metacolina, medido antes (A) y después (B) del enfrentamiento con inhalaciones de OVA.

5 Ratones BALB/c (n=6 por grupo) sensibilizados con ovoalbúmina, fueron tratados con inmunoterapia simulada (sham-IT) o con inmunoterapia con OVA (OVA-IT) sola o combinada con 0,1 µg, 0,03 µg ó 0,01 µg de 1α,25(OH)2 VitD3 antes de enfrentamientos repetidos con inhalaciones de OVA. **:P<0,05, comparado con el de después del enfrentamiento con inhalaciones de OVA; *: P<0,05, comparado con el de los ratones tratados de modo simulado; #:P<0,05, comparado con OVA-IT sola.

10 Figura 2: Niveles séricos de IgE, específica de OVA, antes (barras desnudas) y después (barras rellenas) de enfrentamientos repetidos con inhalaciones de OVA.

*:P<0,05, comparado con los de antes de los enfrentamientos con inhalaciones de OVA. #:P<0,05, comparado con los de los ratones tratados con inmunoterapia simulada (sham-IT). \$:P<0,05, comparado con inmunoterapia con OVA (OVA-IT) sola.

Figura 3: Número de eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar:

15 #:P<0,05, comparado con el de los ratones tratados con inmunoterapia simulada (sham-IT); *:P<0,05, comparado con inmunoterapia con OVA (OVA-IT) sola.

Figura 4: Número de eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar.

#:P<0,05, comparado con el de los ratones tratados con inmunoterapia simulada (sham-IT); *:P<0,05, comparado con Inmunoterapia con OVA (OVA-IT) sola.

Referencias bibliográficas

- Baxter, A.G. & Hodgkin, P.D. (2002). Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat Rev Immunol*, 2, 439-46.
- Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H.J., Alvarez-Cuesta, E., Canonica, G.W., Chapman, M.D., Creticos, P.J., Dayer, J.M., Durham, S.R., Demoly, P., Goldstein, R.J., Ishikawa, T., Ito, K., Kraft, D., Lambert, P.H., Lowenstein, H., Muller, U., Norman, P.S., Reisman, R.E., Valenta, R., Valovirta, E. & Yssel, H. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 81, 401-5.
- Daynes, R.A. & Jones, D.C. (2002). Emerging roles of ppar α in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2, 748-59.
- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific Inhibition of Effector T Cell Function in Humans after Injection of Immature Dendritic Cells. *J Exp Med*, 193, 233-238.
- Foletta, V.C., Segal, D.H. & Cohen, D.R. (1998). Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol*, 63, 139-52.
- Gallucci, S. & Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*, 13, 114-119.
- Herlaar, E. & Brown, Z. (1999). p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today*, 5, 439-47.
- Hibi, A.K., Michalik, L. & Wahli, W. (2002). PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci*, 59, 790-8.
- Jenne, L., Schuler, G. & Steinkasserer, A. (2001). Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends Immunol*, 22, 102-107.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K. & Enk, A.H. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol*, 22, 394-400.
- Li, Q. & Verma, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2, 725-34.

- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 296, 301-5.
- McKay, L.I. & Cidlowski, J.A. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*, 20, 435-59.
- Nencioni, A., Grunebach, F., Zobywlaski, A., Denzlinger, C., Brugger, W. & Brossart, P. (2002). Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol*, 169, 1228-35.
- Pulendran, B., Palucka, K. & Banchereau, J. (2001). Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science*, 293, 253-6.
- Reis e Sousa, C. (2001). Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity*, 14, 495-8.
- Roncarolo, M.G., Levings, M.K. & Traversari, C. (2001). Differentiation of T Regulatory Cells by Immature Dendritic Cells. *J Exp Med*, 193, F5-F10.
- Walker, C. & Zuany-Amorim, C. (2001). New trends in immunotherapy to prevent atopic diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 22, 84-90.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un compuesto de di-hidroxitamina D3 y un alergen para usar en el tratamiento de patologías alérgicas, por inducción y/o aumento de la tolerancia a dicho alergen.
- 2.- Uso según la reivindicación 1, en donde dicho alergen es capaz de inducir o sostener una enfermedad alérgica.
- 5 3.- Uso según la reivindicación 2, en donde dicha enfermedad alérgica es asma.
- 4.- Composición farmacéutica para usar en el tratamiento de patologías alérgicas por inducción y/o aumento de la tolerancia a un alergen, que comprende un compuesto de di-hidroxitamina D3, comprendiendo dicha composición, además, dicho alergen y un diluyente adecuado.
- 10 5.- Composición farmacéutica para usar según la reivindicación 4, en donde dicho alergen es capaz de inducir o sostener una enfermedad alérgica.
- 6.- Composición farmacéutica para usar según la reivindicación 5, en donde dicha enfermedad alérgica es asma.

Figura 1. Grado de respuesta de las vías respiratorias a la inhalación de dosis diferentes de metacolina, medido antes (A) y después (B) del enfrentamiento con inhalaciones de OVA

Figura 1A

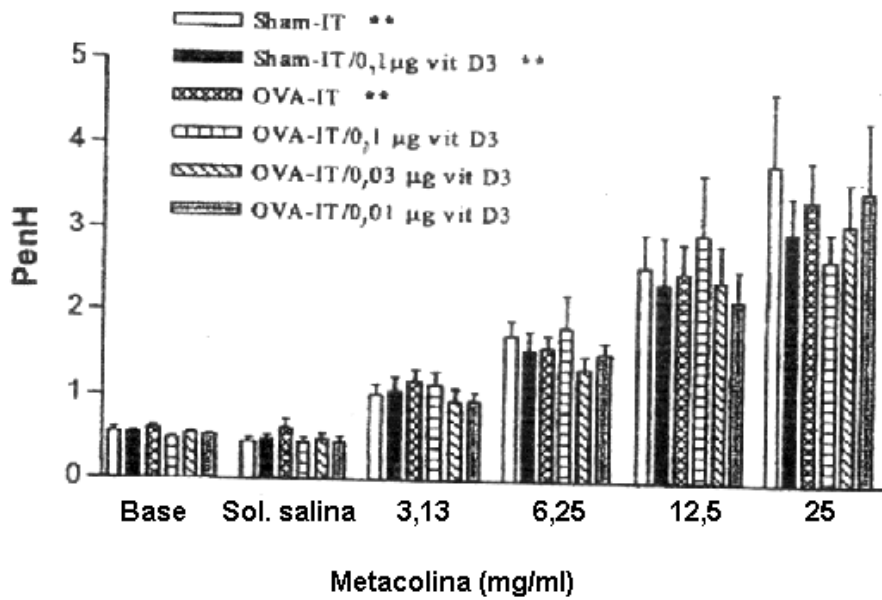


Figura 1 B

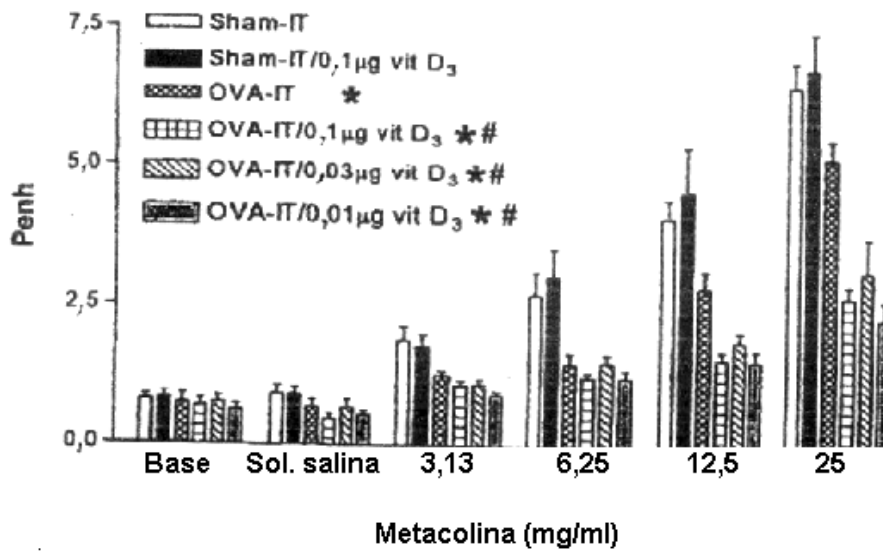


Figura 2. Niveles séricos de IgE específica de OVA, antes (barras desnudas) y después (barras rellenas) de enfrentamientos repetidos con inhalaciones de OVA

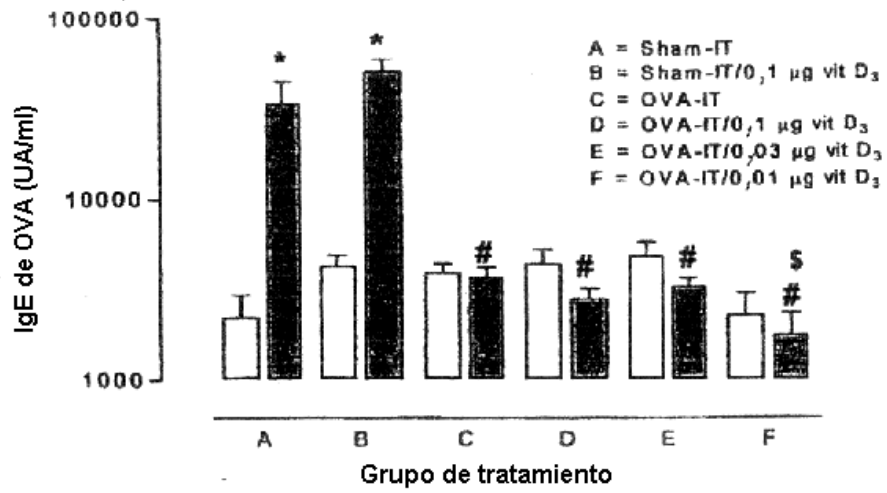


Figura 3. Número de eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar

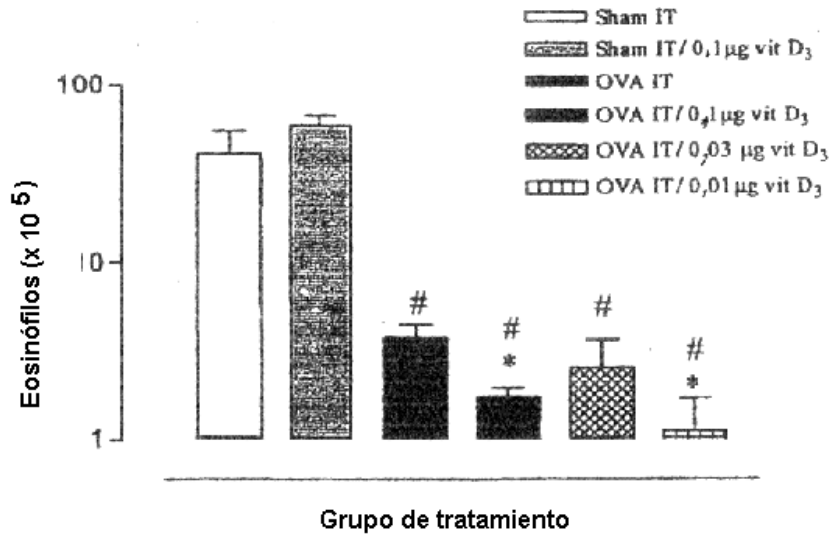


Figura 4. Número de eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar

