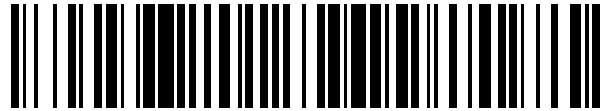


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 440**

21 Número de solicitud: 201331200

51 Int. Cl.:

G01N 33/563 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.08.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.03.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070634

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
RAMÓN Y CAJAL (65.0%)
Ctra. de Colmenar Viejo Km 9,100
28034 MADRID ES y
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN
CARLOS (35.0%)**

72 Inventor/es:

**DE LA HOZ CABALLER, M^a Belén;
MARTÍNEZ BOTAS, Javier;
CERECEDO CARBALLO, Inmaculada;
FERNÁNDEZ RIVAS, Montserrat y
RODRIGUEZ ALVAREZ, Mónica**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO DE LA EFICACIA DE LA INMUNOTERAPIA ORAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA**

57 Resumen:

Método para el pronóstico de la eficacia de la inmunoterapia oral para el tratamiento de la alergia a las proteínas de leche de vaca.

La presente invención se refiere a un método para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca que comprende determinar la presencia de anticuerpos IgE o IgG4 contra los péptidos identificados con las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos en una muestra aislada de un sujeto.

ES 2 530 440 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO DE LA EFICACIA DE LA INMUNOTERAPIA ORAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

Campo de la invención

La presente invención se encuadra en el campo general de la alergología y en particular se refiere a un método para el pronóstico de la eficacia del tratamiento de desensibilización a la leche de vaca.

Estado de la técnica

La alergia por Hipersensibilidad inmediata frente a alimentos no tiene en la actualidad un tratamiento establecido eficaz, la única alternativa para los pacientes es la evitación del mismo hasta alcanzar la tolerancia espontánea al mismo, situación que se alcanza en un alto número de pacientes pero no en todos.

Se habla de alergia a las proteínas de leche de vaca (APLV) cuando un individuo, tras la ingesta de lácteos manifiesta una respuesta anormal (con síntomas que se pueden englobar dentro de las reacciones adversas a alimentos) y en ese proceso hay un mecanismo inmunológico comprobado.

Las proteínas son las responsables de la alergenicidad de la leche de vaca son las caseínas (alfa- caseína, beta-caseina y kappa- caseína) y las seroproteínas (beta lactoglobulina, alfa lactoalbumina, seroalbumina bovina, inmunoglobulinas bovinas y otras proteínas en menor proporción: lactoferrina, transferrina, lipasa que son las proteínas del suero y representan un 2% del total de la leche de vaca entera.

Las caseínas son las principales responsables de la alergia a la leche de vaca.

Actualmente se tiene evidencia que en la alergia a los alimentos existen diferentes fenotipos clínicos de gravedad de las reacciones. Si bien varios factores se han implicado en estas diferencias, el componente geográfico tiene un papel muy importante. Un claro ejemplo es la alergia a frutas, donde los individuos alérgicos a un alimento debido a que reconocen diferentes alérgenos (proteína completa/péptido) tienen diferente gravedad clínica. Así, los individuos alérgicos a melocotón del norte de Europa tienen solo síntomas leves tras su ingestión, mientras los pacientes del sur de Europa presentan reacciones sistémicas graves. Por lo tanto es de máximo interés conocer el patrón de reconocimiento de los alérgenos de un determinado alimento, tanto de las proteínas completas como idealmente de los epítomos de las mismas, que presenta una población determinada.

Actualmente existen diferentes métodos para diagnosticar la alergia de la leche de vaca, pero lo normal es que una vez ocurrida la primera crisis alérgica, se haga una detección de IgE específica a las distintas proteínas de la leche de vaca.

5 La Inmunoterapia Oral (ITO) con alimentos es un procedimiento terapéutico experimental cuyo objetivo es conseguir en los pacientes alérgicos a un determinado alimento la tolerancia al mismo mediante la administración continuada a partir de dosis mínimas del mismo hasta alcanzar la tolerancia de una cantidad habitual del alimento.

10 La leche de vaca es un alimento ubicuo de muy difícil evitación y que produce reacciones graves. En los últimos diez años diversos grupos de investigación han desarrollado protocolos para la administración oral de la leche de vaca para conseguir alcanzar la tolerancia a la misma. En el estado del conocimiento actual el tratamiento alcanza buenos niveles de eficacia en cuanto a alcanzar la tolerancia a la leche de vaca y presenta su mayor problema en cuanto a la seguridad del tratamiento ya que los pacientes presentan un elevado número de reacciones alérgicas durante la realización del procedimiento si bien en 15 la mayoría de las ocasiones son leves y fácilmente tratables, en algunas pocas ocasiones son graves e incluso requieren la administración de adrenalina. Las reacciones durante el procedimiento son una de las mayores dificultades a la hora de incorporar el procedimiento en la práctica habitual de la enfermedad, y por lo tanto extender a un número importante de paciente su utilización, y que se podrían beneficiar del mismo.

20 Existe pues la necesidad de proporcionar un método que pronostique la eficacia del tratamiento de desensibilización a la leche de vaca y por tanto la respuesta del paciente al mismo.

Descripción de la invención

25 La presente invención proporciona la solución a los problemas planteados en el estado de la técnica ya que proporciona un método para pronosticar y hacer el seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca.

30 Así pues en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca (de ahora en adelante método de la presente invención) que comprende determinar la presencia de anticuerpos IgE o IgG4 contra los péptidos identificados con las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos en una muestra aislada de un sujeto.

En una realización particular, un reconocimiento menor del 15% de los péptidos es indicativo de buen pronóstico.

5 En la presente invención por "buen pronóstico" se refiere a baja probabilidad de tener reacciones adversas durante la desensibilización, con una estimación de aproximadamente 3 reacciones alérgicas, y una estimación de aproximadamente 7 semanas en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca.

En una realización particular, un reconocimiento comprendido entre un 15% - 75% de péptidos es indicativo de pronóstico moderado.

10 En la presente invención por pronóstico moderado se refiere a un riesgo moderado de tener reacciones adversas durante la desensibilización, con una estimación de aproximadamente 10 reacciones alérgicas y una estimación de aproximadamente 11 semanas en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca.

En una realización particular, un reconocimiento superior al 75% de péptidos es indicativo de mal pronóstico.

15 En la presente invención por mal pronóstico se refiere a un número alto de reacciones alérgicas con una estimación de aproximadamente 19 reacciones alérgicas y una estimación de 16 semanas en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca.

En una realización en particular de la presente invención, los fragmentos de los péptidos se identifican con las secuencias SEQ ID NO: 18-75

20 En una realización en particular de la presente invención, la muestra a analizar es seleccionada entre sangre, suero u orina.

En una realización en particular de la presente invención, la presencia de los péptidos y/o fragmentos de los mismos se determina mediante inmunoensayo.

25 En una realización en particular de la presente invención, la presencia de los péptidos y/o fragmentos de los mismos se determina mediante microarrays de péptidos.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un microarray para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca según el método de la presente invención que comprende los péptidos de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca (de ahora en adelante kit de la presente invención) según el método de las reivindicaciones 1-6, que comprende los péptidos de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit de la presente invención para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca.

Descripción de las figuras

En la figura 1 se representa la evolución temporal del número de péptidos reconocidos por los pacientes por IgE (0, tiempo antes de empezar el tratamiento de ITO; D, tiempo en el que se alcanza la tolerancia/desensibilización; 6, 12 y 24 meses de seguimientos tras la desensibilización). Los pacientes de alto riesgo reconocen un mayor número de péptidos por IgE ya antes de empezar el tratamiento de ITO, lo cual permite distinguir los pacientes de alto riesgo de los de moderado y bajo riesgo. El número de péptidos IgE que reconocen los distintos grupos de pacientes disminuye con tiempo de seguimiento lo cual es informativo sobre la duración mínima que tiene que tener la ITO con leche de vaca.

a: IgE-alfa-S1-caseína; b: IgE-alfa-S2-caseína, c: IgE-b-caseína, d: IgE-b-lactoglobulina, e: IgE-k- caseína.

En la figura 2 se representa la evolución temporal del número de péptidos reconocidos por los pacientes por IgG4 (0, tiempo antes de empezar el tratamiento de ITO; D, tiempo en el que se alcanza la tolerancia/desensibilización; 6, 12 y 24 meses de seguimientos tras la desensibilización). El número de péptidos que reconocen los distintos grupos de pacientes aumenta durante tiempo de seguimiento lo cual es indicativo del mantenimiento de la tolerancia y por tanto la eficacia del tratamiento con ITO con leche de vaca.

a: IgG4- alfa-S1-caseína; b: IgG4-alfa-S2-caseína, c: IgG4-b-caseína, d: IgG4-b-lactoglobulina, e: IgG4-k- caseína.

Las figuras 3 a 7, muestran el análisis de agrupamiento jerárquico (Análisis de cluster), el análisis estadístico de las distintas regiones reconocidas por los diferentes grupos de pacientes (Análisis estadístico –Gr 1 pacientes de bajo riesgo, Gr 2 pacientes de riesgo moderado y Gr 3 pacientes de riesgo alto-) y la selección de péptidos importantes (key peptide biomarker) (flechas) para la clasificación de los pacientes. Mediante el análisis de

clúster hemos visto que el patrón de reconocimiento inmunológico por anticuerpos IgE antes de empezar el tratamiento (tiempo 0) de los pacientes con alto riesgo es muy parecido y se agrupan en la zona derecha de la gráfica (p5, p9, p11, p19 y p25). Mediante el análisis estadístico hemos localizado aquellas zonas o epítomos con diferencia significativas en el patrón de reconocimiento de los pacientes de alto riesgo respecto a los de bajo riesgo y riesgo moderado. Mediante el análisis bioinformático de machine learning hemos localizado los mejores péptidos para la estimación de la evolución del tratamiento de ITO. Con todo ello hemos seleccionado 58 péptidos (ver secuencias en figura 8) de las proteínas alfa-s1-caseína, alfa-s2-caseína, beta-caseína, kapa-caseína y beta-lactoglobulina que son importantes para a estimación de la evolución del tratamiento de ITO,

Figura 3: alfa-S1-caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 4: alfa-S2-caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 5: b-caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 6: k- caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 7: b-lactoglobulina (IgE) sin ponderar.

La figura 8 muestra la correlación lineal entre el número de péptidos reconocidos de los 58 péptidos importantes y el número de reacciones alérgicas durante el tratamiento de ITO (r^2 0,803) y el tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización (r^2 0,601) de los diferentes pacientes.

La figura 9 muestra la correlación entre el número de péptidos reconocidos de la tabla 2 por IgE antes de empezar el tratamiento de ITO y el número de reacciones alérgicas durante el tratamiento de los diferentes pacientes

La figura 10 muestra la correlación entre el número de péptidos reconocidos de la (tabla 3) lista por IgE antes de empezar el tratamiento de ITO y el tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización de los diferentes pacientes.

Descripción detallada de la invención

Mediante microarrays de péptidos se analizó el patrón de reconocimiento inmunológico (reconocimiento IgE e IgG4) a proteínas de la leche de vaca (alfa-s1-caseína, alfa-s2-caseína, beta-caseína, kapa-caseína y beta-lactoglobulina) en pacientes alérgicos a lo largo del tratamiento de ITO. Los tiempos analizados fueron:

- Antes del tratamiento (0)

- Una vez alcanzada la tolerancia mediante ITO (D)
- 6, 12 y 24 meses tras alcanzada la tolerancia (6, 12 y 24 respectivamente).

Se diseñó un protocolo de ITO para la administración de la leche de vaca en dos fases una fase de inicio consistente en cuatro días con dosis progresivas cada día y seis días más de administración de una única dosis dos veces por semana hasta alcanzar la dosis completa de 200 ml de leche de vaca. Esta pauta sufrió modificaciones en función de la tolerancia a la misma, aparición de patologías intercurrentes ajenas al estudio (fiebre, episodios catarrales, otros procesos infecciosos en particular digestivos, etc.). Se registraron y cuantificaron todas las reacciones que surgieron durante la administración de la leche de vaca tanto en el hospital como fuera del ámbito sanitario

Se seleccionaron pacientes con alergia persistente a proteínas de leche de vaca.

Los criterios de Inclusión para los pacientes fueron:

Niños mayores de 4 años, con el diagnóstico de APLV que no hubiesen alcanzado la tolerancia de forma espontánea.

Para confirmar la persistencia de APLV en el momento de inclusión de los pacientes en el estudio se llevaron a cabo pruebas cutáneas y determinación de IgE específica frente a la leche de vaca y fracciones (betalactoglobulina, alfa lactoalbumina y caseína) y se realizó una provocación doble ciego controlada con placebo frente a leche de vaca.

Se requirió la positividad de las pruebas cutáneas y presencia de IgE específica frente a leche de vaca o cualquiera de sus fracciones y una provocación positiva con la exposición a la leche de vaca que reprodujera síntomas inmediatos de alergia.

Se consideraba una prueba cutánea positiva aquella de igual o superior tamaño que la producida por la histamina y se consideró positiva una determinación de IgE específica superior a 0,35 kU/L determinada por CAP (Thermo Fisher Scientific).

Se excluyeron a los niños diagnosticados de APLV que no cumplieran los criterios previos definidos y aquellos que presentaran intolerancia a la lactosa o reacciones no mediadas por IgE.

Se incluyeron un total de 47 pacientes de ellos 12 fueron excluidos por presentar algún criterio de exclusión. Un total de 35 niños cumplieron los criterios de inclusión y a todos se les ofreció el tratamiento con ITO con leche de vaca. De los 35 un total de 24 aceptaron el

tratamiento y los otros 7 niños rechazaron el tratamiento pero aceptaron mantenerse en el estudio como grupo control.

En cuanto a la eficacia del tratamiento se consideró eficacia alcanzar sin reacciones adversas la cantidad 200 ml de leche de vaca al día.

- 5 En cuanto a la seguridad de la pauta de ITO con leche de vaca, se consideraron el número de reacciones alérgicas presentadas por cada paciente durante el procedimiento, la necesidad de protección con medicación antialérgica (corticoides y antihistamínicos) y la duración de la pauta.

10 Los 24 pacientes incluidos alcanzaron la dosis de 200 ml luego el procedimiento fue eficaz en todos los casos.

Se clasificaron a los pacientes según duración mayor o menor a 8 semanas (mediana de duración del procedimiento con todos los pacientes), número de reacciones mayor a 7 (mediana de reacciones del grupo) y la necesidad o no de medicación antialérgica (antihistamínicos y/o corticoides) para la administración de las dosis (Si, No) .

15 Según estos criterios los pacientes se clasificaron en tres grupos

- Bajo riesgo (menos de 8 semanas, menos de 7 reacciones y no necesidad de medicación). Este perfil lo presentaron 7 pacientes,
- Riesgo moderado (más de 8 semanas y/o más de 7 reacciones y/o premedicación con antihistamínicos). Este perfil lo presentaron 12 pacientes,
- 20 – Alto riesgo (más de 8 semanas y más de 7 reacciones y premedicación completa (antihistamínicos y corticoides). Este perfil lo presentaron 5 pacientes

Correlacionamos el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de los sueros de los pacientes para las distintas proteínas antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con la respuesta posterior a dicho tratamiento. Los pacientes de bajo riesgo reconocieron pocos péptidos, los pacientes con mucho riesgo reconocieron muchos péptidos y los
25 pacientes con riesgo moderado reconocieron un número intermedio de péptidos. Hemos encontrado 58 epítomos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV (tabla 1) que son informativos para el pronóstico de la respuesta a la ITO frente a leche de vaca. Además la evolución temporal en el reconocimiento por IgE e IgG4 de estos 58
30 epítomos/péptidos puede ser importante para determinar el tiempo de duración de la ITO (aumento de reconocimiento IgG4 y disminución de IgE), y señalar el estado inmunológico del paciente de tolerancia (tolera el alimento requiriendo exposición al alérgeno a diario y sin

interrupción) o desensibilización (tolera el alimento y la suspensión del mismo durante un periodo de tiempo no cambia el estado de tolerancia), y por tanto la eficacia global de la ITO con leche de vaca.

ID	Proteína	Posición	Secuencia
1	alfa-s1-caseina	6	SEQ ID NO: 18
2	alfa-s1-caseina	9	SEQ ID NO: 19
3	alfa-s1-caseina	11	SEQ ID NO: 20
4	alfa-s1-caseina	25	SEQ ID NO: 21
5	alfa-s1-caseina	28	SEQ ID NO: 22
6	alfa-s1-caseina	31	SEQ ID NO: 23
7	alfa-s1-caseina	34	SEQ ID NO: 24
8	alfa-s1-caseina	37	SEQ ID NO: 25
9	alfa-s1-caseina	43	SEQ ID NO: 26
10	alfa-s1-caseina	45	SEQ ID NO: 27
11	alfa-s1-caseina	46	SEQ ID NO: 28
12	alfa-s1-caseina	49	SEQ ID NO: 29
13	alfa-s1-caseina	52	SEQ ID NO: 30
14	alfa-s1-caseina	59	SEQ ID NO: 31
15	alfa-s1-caseina	60	SEQ ID NO: 32
16	alfa-s2-caseina	7	SEQ ID NO: 33
17	alfa-s2-caseina	9	SEQ ID NO: 34
18	alfa-s2-caseina	11	SEQ ID NO: 35
19	alfa-s2-caseina	14	SEQ ID NO: 36
20	alfa-s2-caseina	21	SEQ ID NO: 37
21	alfa-s2-caseina	22	SEQ ID NO: 38
22	alfa-s2-caseina	23	SEQ ID NO: 39
23	alfa-s2-caseina	24	SEQ ID NO: 40
24	alfa-s2-caseina	28	SEQ ID NO: 41
25	alfa-s2-caseina	32	SEQ ID NO: 42
26	alfa-s2-caseina	35	SEQ ID NO: 43
27	alfa-s2-caseina	50	SEQ ID NO: 44
28	alfa-s2-caseina	52	SEQ ID NO: 45
29	beta-caseina	1	SEQ ID NO: 46
30	beta-caseina	15	SEQ ID NO: 47
31	beta-caseina	25	SEQ ID NO: 48
32	beta-caseina	28	SEQ ID NO: 49
33	beta-caseina	32	SEQ ID NO: 50
34	beta-caseina	34	SEQ ID NO: 51
35	beta-caseina	36	SEQ ID NO: 52
36	beta-caseina	43	SEQ ID NO: 53

37	beta-caseina	45	SEQ ID NO: 54
38	beta-caseina	47	SEQ ID NO: 55
39	beta-caseina	48	SEQ ID NO: 56
40	beta-caseina	51	SEQ ID NO: 57
41	beta-caseina	53	SEQ ID NO: 58
42	beta-caseina	54	SEQ ID NO: 59
43	beta-caseina	56	SEQ ID NO: 60
44	beta-caseina	59	SEQ ID NO: 61
45	beta-caseina	61	SEQ ID NO: 62
46	beta-caseina	64	SEQ ID NO: 63
47	kapa-caseina	3	SEQ ID NO: 64
48	kapa-caseina	5	SEQ ID NO: 65
49	kapa-caseina	7	SEQ ID NO: 66
50	kapa-caseina	8	SEQ ID NO: 67
51	kapa-caseina	17	SEQ ID NO: 68
52	kapa-caseina	18	SEQ ID NO: 69
53	beta-lactoglobulina	6	SEQ ID NO: 70
54	beta-lactoglobulina	42	SEQ ID NO: 71
55	beta-lactoglobulina	43	SEQ ID NO: 72
56	beta-lactoglobulina	44	SEQ ID NO: 73
57	beta-lactoglobulina	46	SEQ ID NO: 74
58	beta-lactoglobulina	47	SEQ ID NO: 75

La tabla 1 muestra los 58 epitopos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV.

Ejemplo 1:

Las muestras obtenidas de 3 pacientes se incubaron en la superficie del microarray que
 5 contenía 27 péptidos, ID: 2 (α -s1-casein p9), 4 (α -s1-casein p25), 8 (α -s1-casein p37), 10 (α -
 α -s1-casein p45), 11 (α -s1-casein p46), 14 (α -s1-casein p59), 19 (alfa-s2-caseina p14), 20
 (alfa-s2-caseina p21), 21 (alfa-s2-caseina p22), 22 (alfa-s2-caseina p23), 23 (alfa-s2-caseina
 p24), 27 (alfa-s2-caseina p50), 34 (beta-caseina p34), 36 (beta-caseina p43), 38 (beta-
 caseina p47), 39 (beta-caseina p48), 41 (beta-caseina p53), 42 (beta-caseina p54), 45 (beta-
 10 caseina p61), 50 (kapa-caseina p8), 51 (kapa-caseina p17), 52 (kapa-caseina p18), 53
 (beta-lactoglobulina p6), 54 (beta-lactoglobulina p42), 55 (beta-lactoglobulina p43), 56 (beta-
 lactoglobulina p44) y 58 (beta-lactoglobulina p47); ver figura 9 y 10

Los microarrays se incubaron con anticuerpos fluorescentes anti IgE human marcado con
 Alexa 546 y anti IgG4 marcado con Alexa 647, para detectar la presencia en el suero de los

pacientes de anticuerpos IgE e IgG4 frente a los distintos péptidos de las proteínas alérgicas de leche de vaca.

Los microarrays fueron escaneados y los resultados se cuantificaron y normalizaron para transformar la señal de fluorescencia en un parámetro numérico (unidades arbitrarias de fluorescencia o z-score). Se calcularon el número de péptidos con una señal de fluorescencia superior a 3 (z-score>3). El primer paciente reconoce 2 péptidos, el segundo paciente 8 péptidos y el tercer paciente reconoce 15 péptidos.

El paciente con un reconocimiento de 2 péptidos tiene un buen pronóstico (baja probabilidad de tener reacciones adversas durante la desensibilización - estimación 3 reacciones alérgicas, ver figura 9- y de tardar poco tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca – estimación 7 semanas, ver figura 10-).

Pacientes con un reconocimiento de 8 péptidos tiene un pronóstico intermedio (riesgo moderado de tener reacciones adversas durante la desensibilización – estimación 10 reacciones alérgicas, ver figura 9- y de tardar un tiempo intermedio en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca – estimación 11 semanas, ver figura 10-).

Pacientes con un reconocimiento de 15 péptidos tiene un mal pronóstico (alta probabilidad de tener reacciones adversas durante la desensibilización – estimación 19 reacciones alérgicas, ver figura 9- y de tardar mucho tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca – estimación 16 semanas, ver figura 10-).

ID	Proteína	Secuencia
2	α -s1-casein p9	SEQ ID NO:19
4	α -s1-casein p25	SEQ ID NO: 21
8	α -s1-casein p37	SEQ ID NO: 25
10	α -s1-casein p45	SEQ ID NO: 27
19	alfa-s2-caseina p14	SEQ ID NO: 36
20	alfa-s2-caseina p21	SEQ ID NO: 37
21	alfa-s2-caseina p22	SEQ ID NO: 38
34	beta-caseina p34	SEQ ID NO: 51
36	beta-caseina p43	SEQ ID NO: 53
41	beta-caseina p53	SEQ ID NO: 58
42	beta-caseina p54	SEQ ID NO: 59
45	beta-caseina p61	SEQ ID NO: 62
52	kapa-caseina p18	SEQ ID NO: 69
54	beta-lactoglobulina p42	SEQ ID NO: 71
55	beta-lactoglobulina p43	SEQ ID NO: 72

Tabla 2: péptidos que mejor estiman el número de reacciones durante la ITO

Fórmula: Estimación de reacciones=1.1733 N° de péptidos + 1.0362

N° péptidos: 2, Estimación de reacciones: 3

N° péptidos: 8, Estimación de reacciones: 10

5 N° péptidos: 15, Estimación de reacciones: 19

ID	Péptido	Secuencia
11	α-s1-casein p46	SEQ ID NO: 28
14	α-s1-casein p59	SEQ ID NO: 31
19	alfa-s2-caseina p14	SEQ ID NO: 36
20	alfa-s2-caseina p21	SEQ ID NO: 37
21	alfa-s2-caseina p22	SEQ ID NO: 38
22	alfa-s2-caseina p23	SEQ ID NO: 39
23	alfa-s2-caseina p24	SEQ ID NO: 40
27	alfa-s2-caseina p50	SEQ ID NO: 44
36	beta-caseina p43	SEQ ID NO: 53
38	beta-caseina p47	SEQ ID NO: 55
39	beta-caseina p48	SEQ ID NO: 56
50	kapa-caseina p8	SEQ ID NO: 67
51	kapa-caseina p17	SEQ ID NO: 68
53	beta-lactoglobulina p6	SEQ ID NO: 70
55	beta-lactoglobulina p43	SEQ ID NO: 72
58	beta-lactoglobulina p47	SEQ ID NO: 75

Tabla 3: péptidos que mejor estiman el tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO.

10 Fórmula: Estimación de tiempo de tratamiento (semanas) = (0.7318 * N° de péptidos) + 5.1419

N° péptidos: 2, Estimación de tiempo de tratamiento (semanas): 7

N° péptidos: 8, Estimación de tiempo de tratamiento (semanas): 11

N° péptidos: 15, Estimación de tiempo de tratamiento (semanas): 16

REIVINDICACIONES

1. Método para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral que comprende determinar la presencia de anticuerpos IgE o IgG4 contra los péptidos identificados con las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos, identificados con las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 18-75, en una muestra aislada de un sujeto.
2. Método según la reivindicación 1, donde:
 - un reconocimiento menor del 15% de los péptidos es indicativo de buen pronóstico,
 - un reconocimiento de entre 15% - 75% de los péptidos es indicativo de pronóstico moderado
 - un reconocimiento superior al 75% de péptidos es indicativo de mal pronóstico
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra a analizar es seleccionada entre sangre, suero u orina.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la presencia de los péptidos se determina mediante inmunoensayo.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde la presencia de los péptidos se determina mediante microarrays de péptidos.
6. Microarray para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca según el método de las reivindicaciones 1-5 que comprende los péptidos de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 o fragmentos de los mismos identificados con las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 18-75.
7. Kit para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca según el método de las reivindicaciones 1-5, que comprende los péptidos de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 o fragmentos de los mismos identificados con las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 18-75.
8. Uso del kit según la reivindicación 7 para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca.

Figura 1

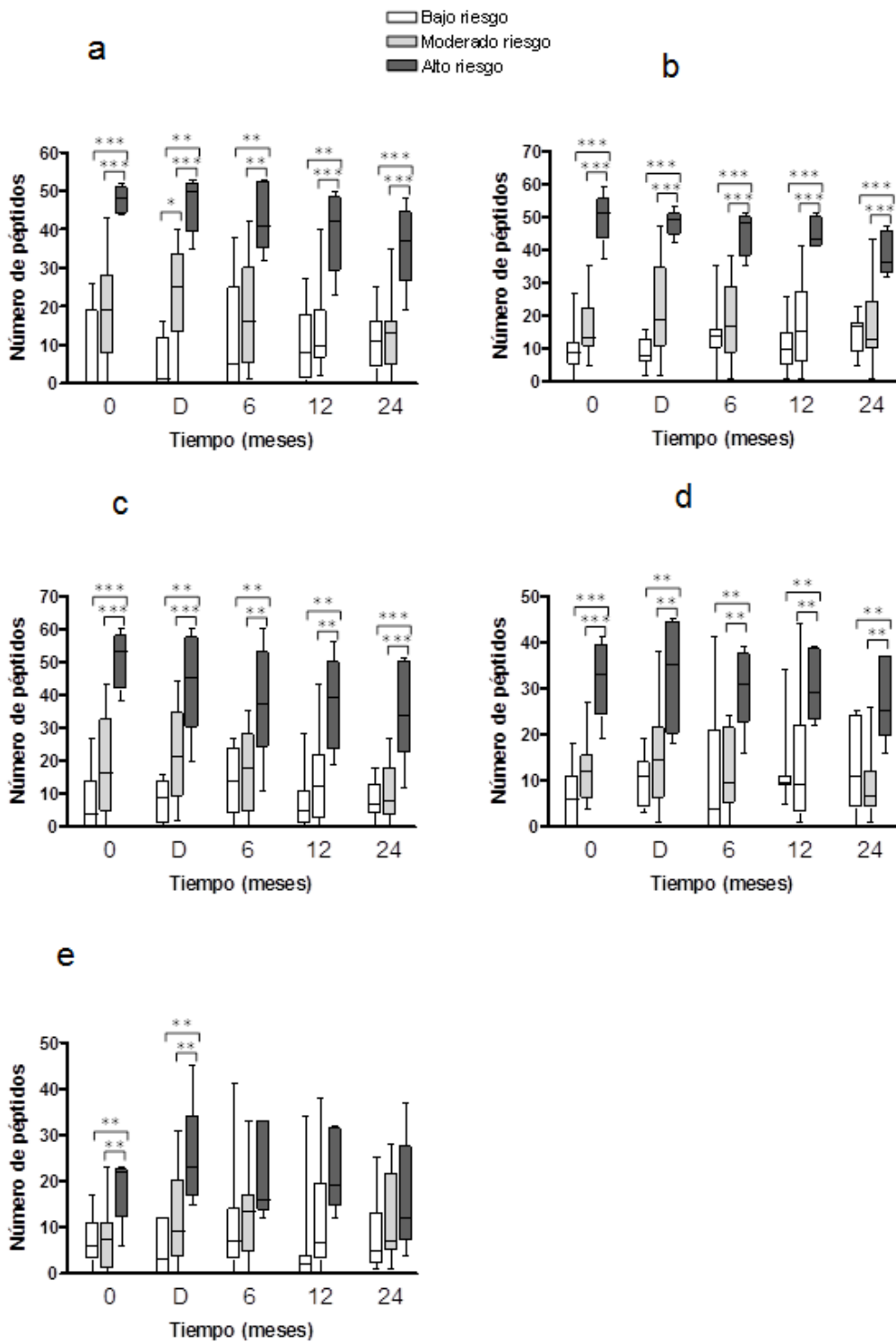
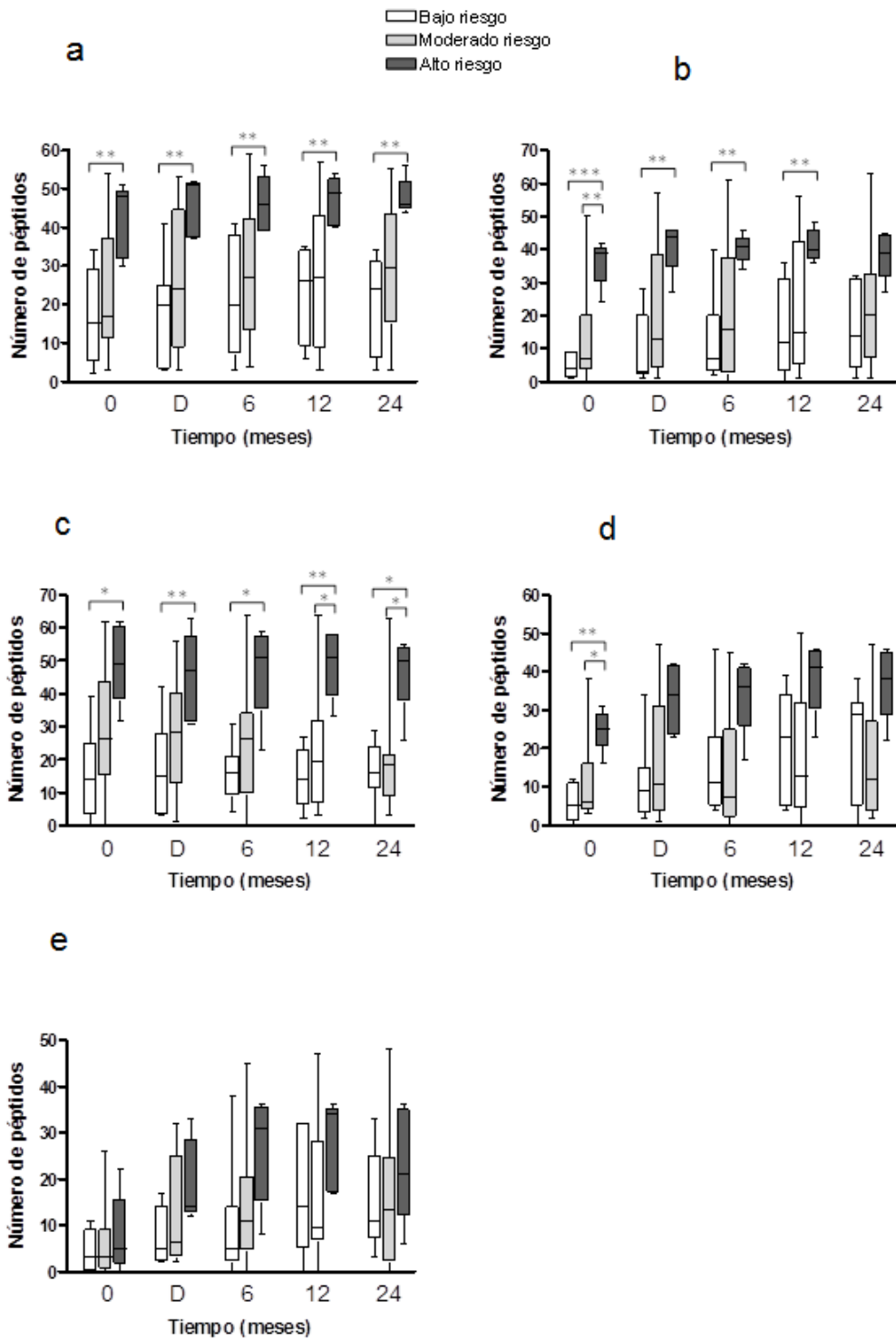


Figura 2



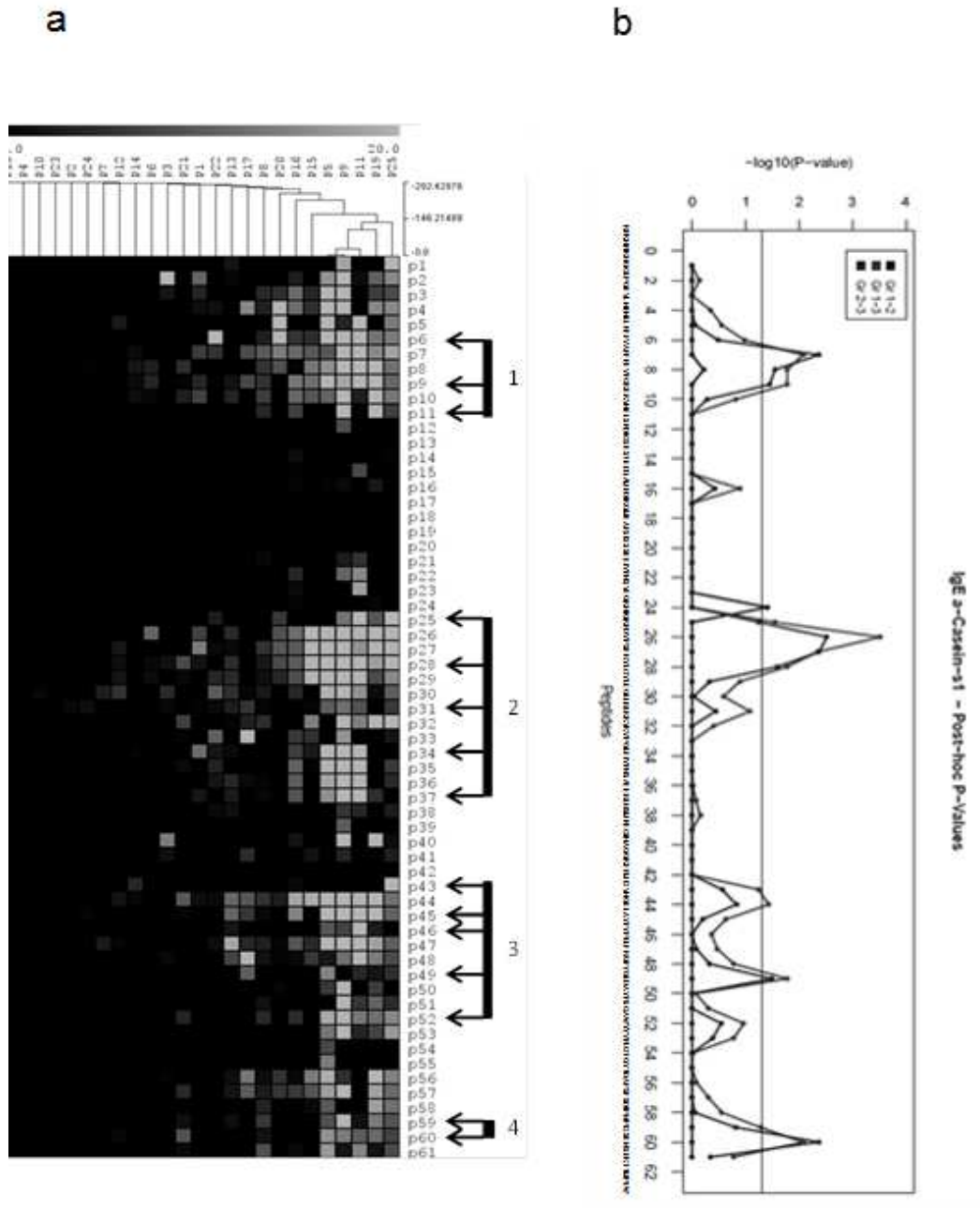


Figura 4

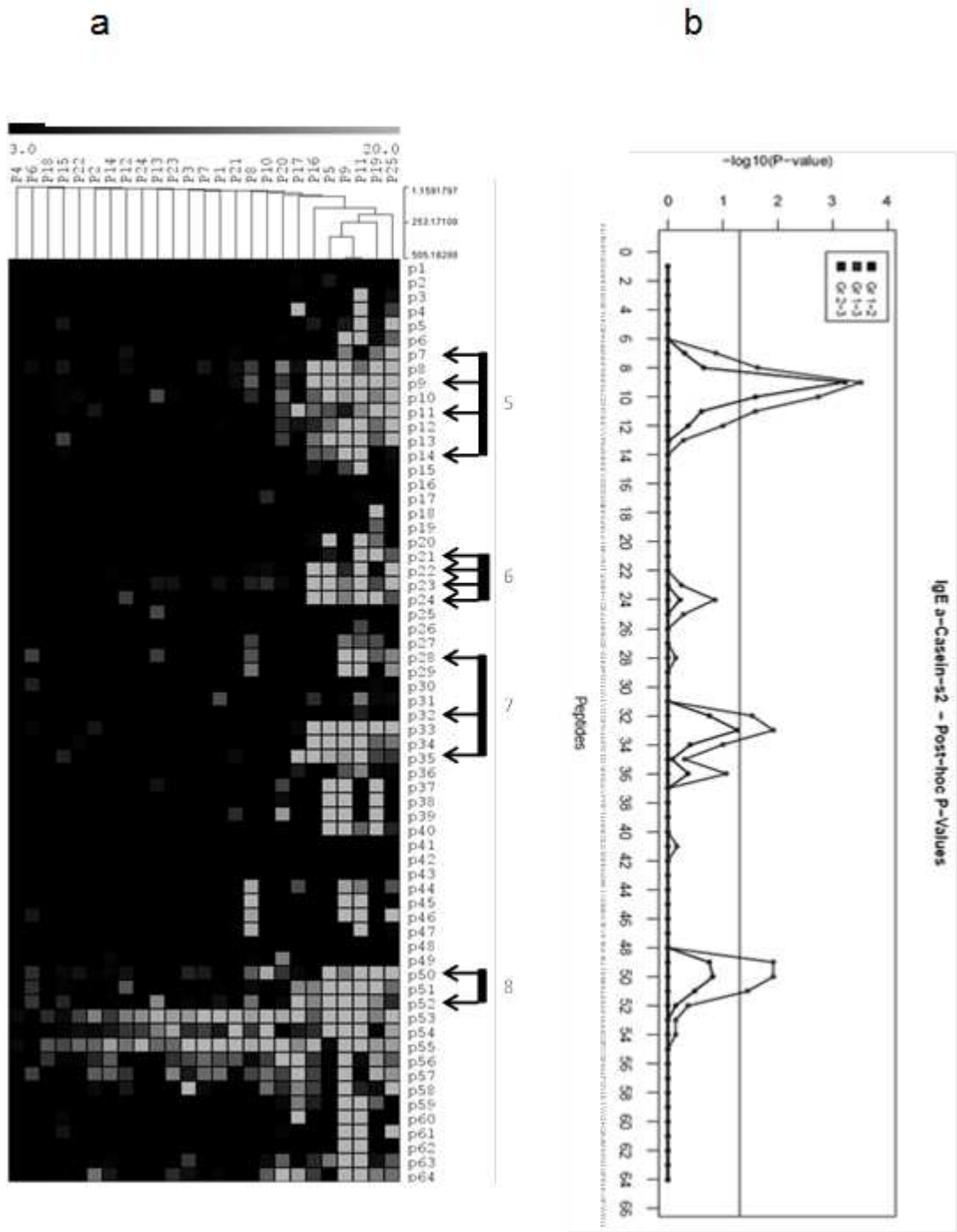


Figura 5

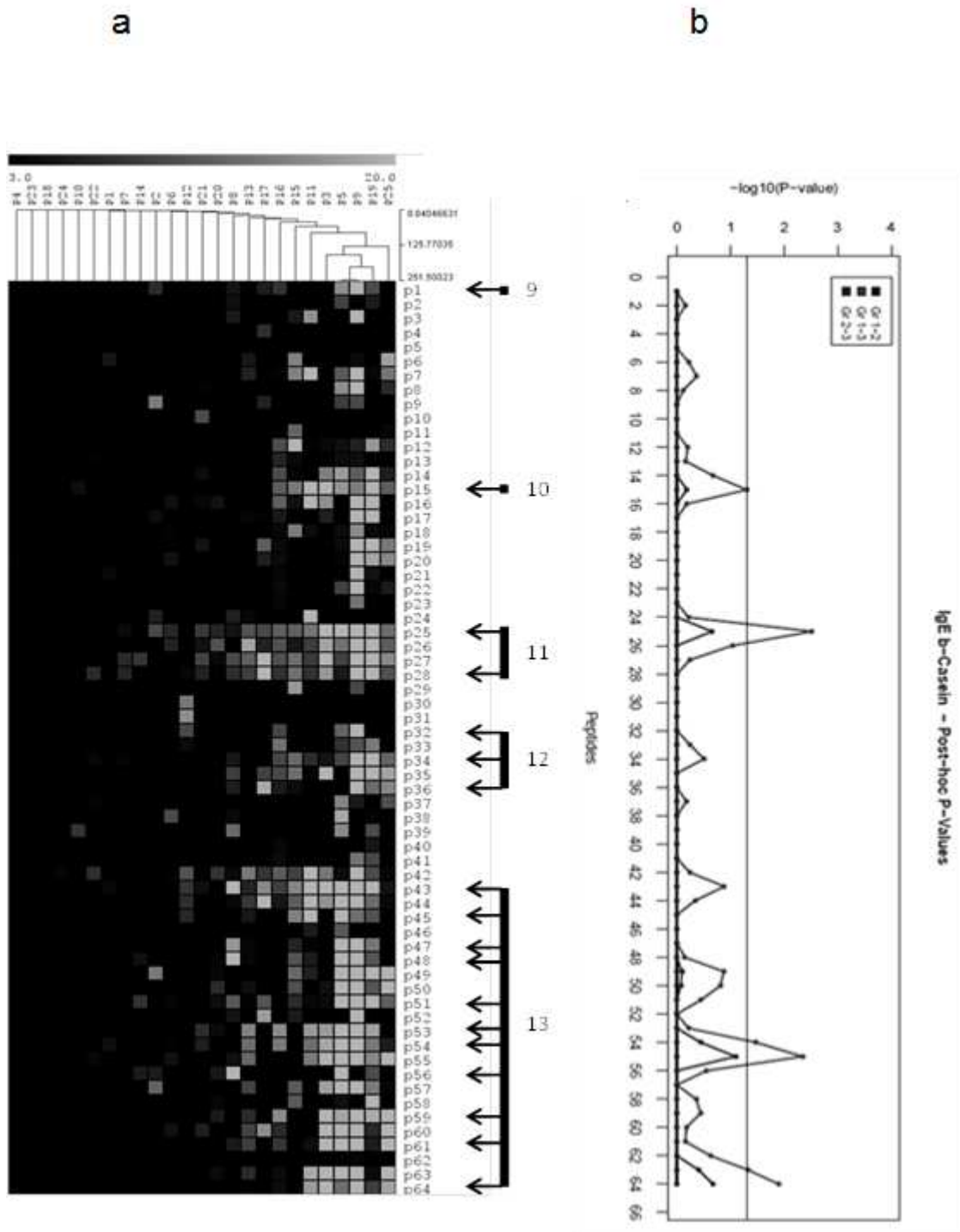
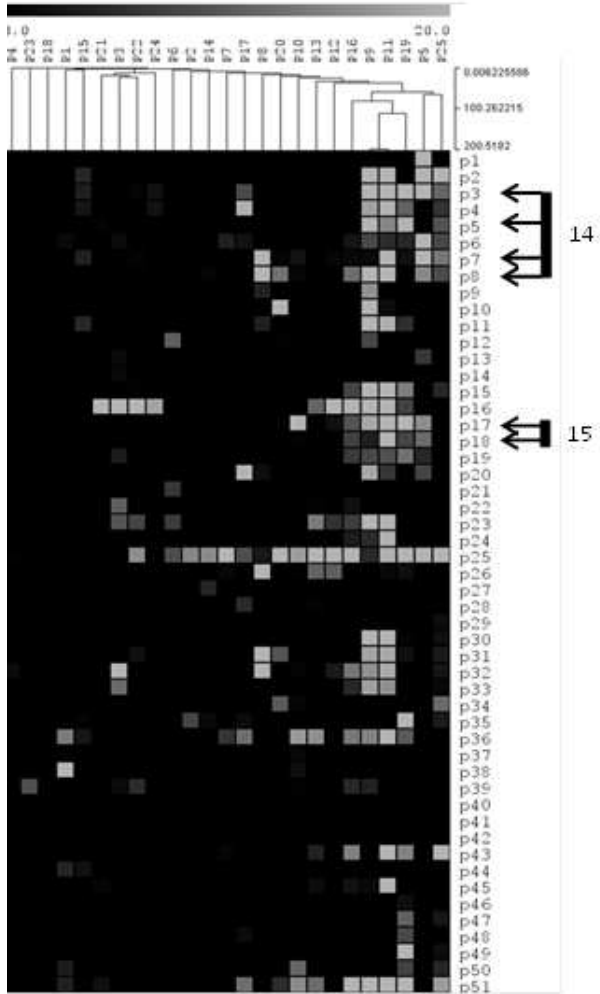


Figura 6

a



b

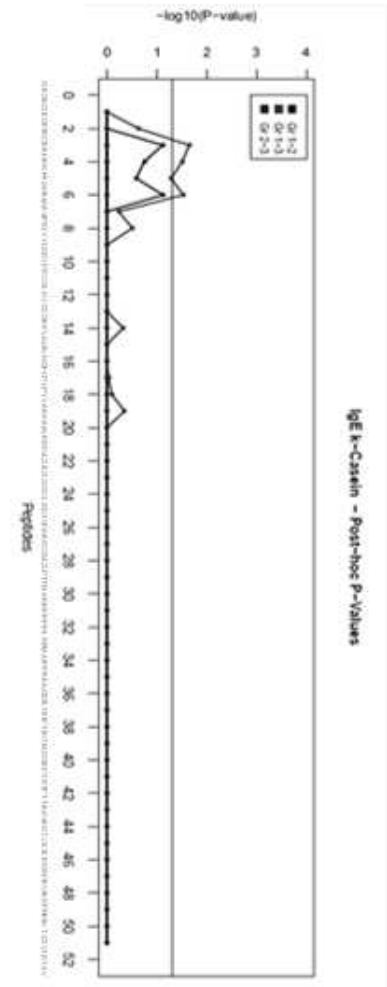


Figura 7

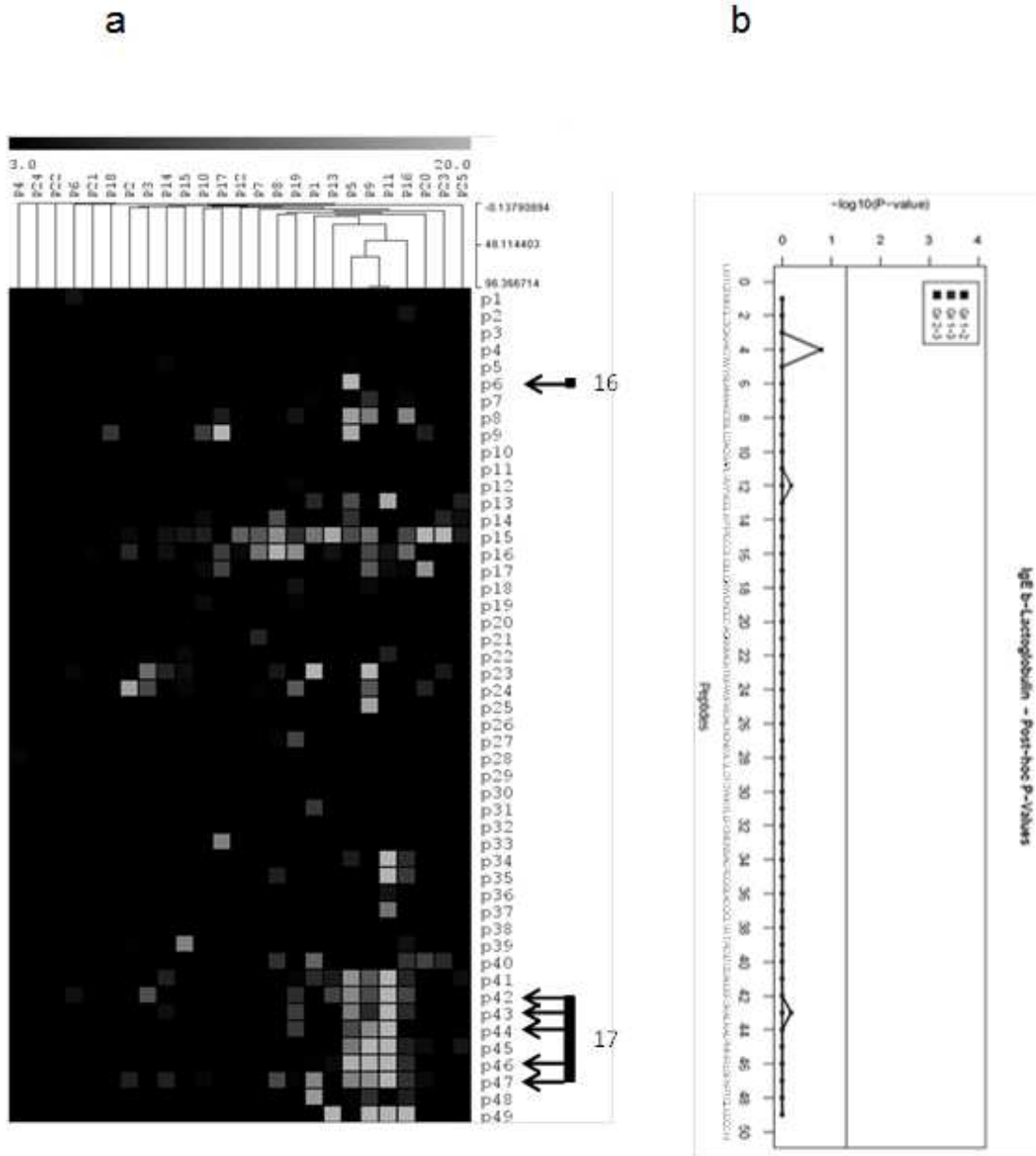


Figura 8

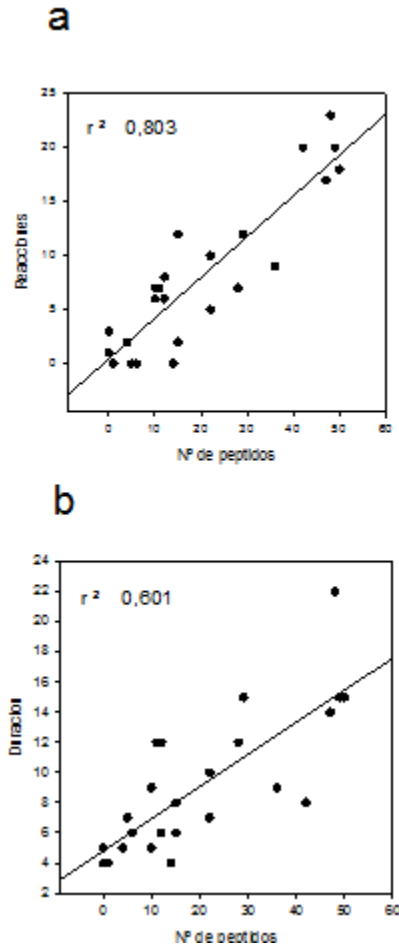


Figura 9

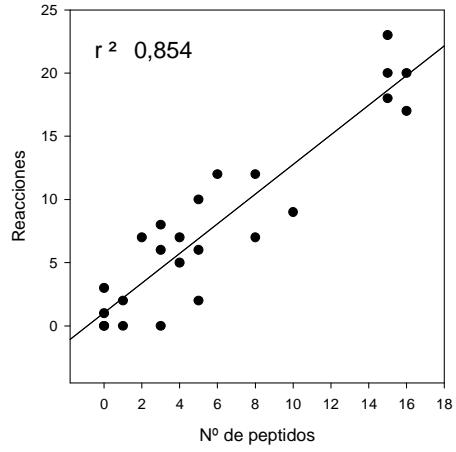


Figura 10

