

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 619**

51 Int. Cl.:

A61K 39/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2010 E 10707962 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2393511**

54 Título: **Péptidos contiguos superpuestos para el tratamiento de la alergia al polen de abedul**

30 Prioridad:

09.02.2009 US 151045 P

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

11.05.2016

73 Titular/es:

**ANERGIS SA (100.0%)
34b chemin du Polny
1066 Epalinges, CH**

72 Inventor/es:

**REYMOND, CHRISTOPHE y
SPERTINI, FRANCOIS**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 569 619 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

Péptidos contiguos superpuestos para el tratamiento de la alergia al polen de abedul

5 Campo de la invención

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos núm. de serie 61/151,045 presentada el 9 de febrero de 2009 cuya descripción se incorpora por este medio como referencia.

10 La presente invención se refiere a péptidos contiguos superpuestos (COP) derivados del Bet v 1 alérgeno principal del polen de abedul y el uso de tales compuestos en medicina. Los compuestos y métodos de tratamiento de la invención se contemplan por ser útiles en el tratamiento de la alergia al polen de abedul y acelerar ampliamente su tratamiento.

15 Antecedentes de la invención

La enfermedad alérgica mediada por IgE parece ser muy común particularmente en los países industrializados en los que hasta una cuarta parte de la población está afectada por la rinitis alérgica. (Settipane, R.A., *Allergy Asthma Proc*, 22(4):185-9 (2001)). Además las personas que sufren de rinitis alérgica muestran una menor calidad de vida que una sana, (Bousquet, J., y otros, *J Allergy Clin Immunol*, 94(2):182-8 (1994)) con sólo unos pocos que entran en remisión espontáneamente. Aproximadamente el 25 % de todos los pacientes alérgicos responden al polen de árboles. Entre ellas, el 90 % muestran reactividad con el extracto de polen de abedul en las pruebas cutáneas (Pruebas de Punción Cutánea, SPT). Las alergias son provocadas por proteínas ambientales de secuencia peptídica conocida y para alergia al polen de abedul la mayoría de los pacientes muestran hipersensibilidad a Bet v 1, el principal alérgeno del polen de abedul. Bet v 1 es parte de una familia de proteínas que juega un papel importante en la defensa de la planta y por lo tanto se encontró reacción cruzada de proteínas Bet v 1 en un número de plantas. (Breiteneder, H. y otros, *J Allergy Clin Immunol*, 113(5):821-30 (2004)). Además, la alergia al polen de abedul se relaciona frecuentemente con las alergias a otros árboles de la familia Fagales y con ciertas alergias a los alimentos, como las de la avellana, manzana, melón y melocotón. (Son, D. Y. y otros, *Eur J Nutr*, 38(4):201-15 (1999) y Jahn-Sclunid y otros, *J Allergy Clin Immunol*, 116(1):213-9 (2005)).

30 El único tratamiento orientado a la causa de alergia mediada por IgE es la inmunoterapia específica (SIT). Los tratamientos consisten en la inyección de dosis crecientes de alérgenos por extensos períodos de tiempo (de tres a cinco años) para inducir tolerancia en el paciente alérgico. Varios estudios mostraron el beneficio de esta terapia en la respuesta alérgica, particularmente, en tratamientos a largo plazo. (Drachenberg, K.J. y otros, *Allergol Immunopathol*, 31(2):77-82 (2003) y Dam Petersen, K. y otros, *Allergol Immunopathol* 33(5):264-269 (2005)). Sin embargo, se observaron una serie de efectos secundarios particularmente durante las terapias de ultra afluencia, donde hasta el 30 % de los pacientes tienen que ser tratados por síntomas alérgicos durante el curso del tratamiento. (Birnbaum y otros, *Clin. Exp. Allergy*, 33(1):58-64 (2003)). Por tanto, existe una fuerte necesidad médica de una alternativa a la SIT en la forma de un tratamiento más corto con una seguridad aceptable.

40 Se han probado diferentes enfoques para mejorar la seguridad y la eficacia de la SIT. Las formulaciones o extractos existentes se han mejorado mediante la adición de adyuvantes, como MPL (Terapéutica de la Alergia), (Drachenberg, K.J. y otros, *Allergol Immunopathol*, 31(5):270-7 (2003)) secuencias de DNA (Hartl, A. y otros, *Allergy*, 59(1):65-73 (2004)) o bacteriófago combinado con CpG (Martinez Gomez, J.M. y otros, *Pharm. Res.*, 24(10): 1927-35 (2007)) que aumentan la respuesta inmune TH1, lo que permite así las posibles reducciones en la cantidad de extracto alérgico. Alérgenos definidos se usan en lugar de extractos totales. En el caso de polen de abedul, un ensayo clínico con Bet v 1 recombinante ha demostrado una eficacia equivalente a extractos totales de polen de abedul (Pauli, G. y otros, *J. Allergy Clin. Immunol*, 122(5):951-60 (2008)).

50 Para disminuir la aparición de los síntomas alérgicos resultantes del tratamiento, diferentes grupos exploraron el uso de productos con potencial hipoalérgico, concretamente que muestran la unión IgE reducida. Particularmente, los péptidos que abarcan un número limitado de epítomos de células T se usaron para la inmunoterapia con alérgenos de caspa de gato con eficacia limitada (Campbell, JD y otros, *J Exp Med.*, 206(7): 1535-47 (2009)). Sin embargo, los alérgenos albergan una gran variedad de epítomos de células T en dependencia, en parte, del tipo HLA del paciente. Por ejemplo, los epítomos de células T se encuentran dispersos a lo largo de la secuencia de Bet v 1, a excepción para una región corta (Jahn-Schmid B. y otros, *J Allergy Clin Immunol*, 1116(1):213-9 (2005)). Por lo tanto un producto de inmunoterapia eficiente debería contener preferentemente la secuencia completa del alérgeno en lugar de epítomos seleccionados de células T.

60 El uso de fragmentos de alérgenos sigue siendo atractivo, basado en la evidencia de que la IgE humana reconoce principalmente epítomos no contiguos que pueden separarse por la fragmentación del alérgeno. Dos fragmentos contiguos de Bet v 1 o formas triméricas de Bet v 1 se ensayaron en un estudio de fase I en humanos y mostraron una tendencia hacia la mejora del bienestar, pero no proporcionaron una mejora significativa en las puntuaciones de los síntomas de la medicación (Niederberger, V. y otros, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (2): 14677-82 (2004)). En ese estudio, sin embargo, se observaron un número de eventos adversos, la mayoría de los cuales ocurrieron horas después de las inyecciones (Purohit, A. y otros, *Clin Exp Allergy* (2008)). Tres fragmentos del alérgeno principal del

veneno de abeja, concretamente, la fosfolipasa A2, se ensayaron también en humanos, mostrando una excelente seguridad debido a la unión de IgE reducida aunque obteniendo niveles elevados de IgG4 y IL-10 (Fellrath y otros, J. Allergy CHn. Immunol, 111 : 854-861 (2003)). Se diseñó un método para seleccionar péptidos contiguos superpuestos (COP) para el tratamiento de alergias que en conjunto forman la secuencia completa de aminoácidos de un alérgeno, lo que proporciona así todos los posibles epítomos de células T del alérgeno, aunque se tenga la unión de IgE reducida (Solicitud de Patente WO2004/081028 A2). Tales fragmentos seleccionados muestran una capacidad reducida para reformar la estructura terciaria original del alérgeno, en su caso, lo que resulta en una capacidad reducida para unir IgE y por lo tanto para provocar reacciones alérgicas en humanos.

10 Breve descripción de la invención

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona péptidos contiguos superpuestos (COPs) como una composición para el tratamiento de alergias al polen del abedul. Específicamente, se proporcionan COPs a partir de la secuencia del alérgeno principal de polen de abedul Bet v 1 que proporcionan todos los potenciales epítomos de células T, pero están desprovistos de la estructura tridimensional del alérgeno original, lo que potencialmente reduce por tanto su capacidad de unir IgE.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de inmunoterapia específica (SIT) capaz de reducir los síntomas alérgicos después de algunas administraciones en un período corto de tiempo. Esta terapia consiste en administrar repetidamente COPs específicos a los humanos que sufren de alergia al polen del abedul. La administración puede realizarse por vía sistémica, transdérmica, subcutánea intradérmica, o por vía oral, o vías mucosas que incluyen las rutas sublingual e intestinal. La administración puede, en algunas modalidades repetirse cinco veces durante dos meses en comparación con 3 a 5 años para la SIT actual. La cantidad administrada de producto activo (COPs) puede alcanzar un valor acumulado equivalente a la cantidad molar de la cantidad de Bet v 1 que se administra durante tres años de tratamiento SIT.

Específicamente, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de fragmentos de péptidos contiguos superpuestos que comprenden un primer péptido que comprende la secuencia desde el aminoácido 2 hasta los aminoácidos 42-52 de sec. con núm. de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene; un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 42-52 para los aminoácidos 96-131 de la sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene y un tercer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 96-131 para el aminoácido 160 de la sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene. De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, el primer y segundo péptidos se superponen entre sí por 1 a 11 aminoácidos. De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, el segundo y tercer péptidos se superponen entre sí por 5 a 20 aminoácidos. Las composiciones particularmente preferidas comprenden la combinación del péptido que tiene la sec. con núm de ident.: 1, el péptido que tiene la sec. con núm de ident.: 2 y el péptido que tiene la sec. con núm de ident.: 3 o la combinación del péptido que tiene la sec. con núm de ident.: 6, el péptido que tiene la sec. con núm de ident.: 7 y el péptido que tiene la sec. con núm de ident.: 8.

Las composiciones de COP preferidos incluyen aquellos en los que los péptidos son capaces después de la administración en los humanos de la inducción de un aumento de 10 veces en los anticuerpos específicos IgG4 para alérgeno Bet v 1 de polen de abedul por encima del nivel de IgG4 presente antes del tratamiento en un panel de al menos 15 individuos sensibles a polen de abedul. Otras composiciones preferidas se caracterizan en que los péptidos son capaces después de la administración en humanos de la inducción aproximada de un aumento de 5 veces en IL-10 con el alérgeno Bet v 1 de polen de abedul por encima del nivel de IL-10 presente antes del tratamiento en un panel de al menos 15 individuos sensibles a polen de abedul.

Además se proporcionan péptidos que comprenden la secuencia desde el aminoácido 2 hasta los aminoácidos 42-52 de sec. con núm de ident.: 9 y péptidos que tienen al menos 90 % de identidad de secuencia con ésta en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene. Particularmente preferidos son los péptidos que tienen la secuencia de sec. con núm de ident.: 1 o de sec. con núm de ident.:6.

Además se proporcionan péptidos que comprenden la secuencia desde los aminoácidos 42-52 hasta los aminoácidos 96-131 de sec. con núm de ident.: 9 y péptidos que tienen al menos 90 % de identidad de secuencia con ésta en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene. Particularmente preferidos son los péptidos que tienen la secuencia de sec. con núm de ident.: 2 o de sec. con núm de ident.:7.

Además se proporcionan péptidos que comprenden la secuencia desde los aminoácidos 96-131 hasta el aminoácido 160 de sec. con núm de ident.: 9 y péptidos que tienen al menos 90 % de identidad de secuencia con ésta en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene. Particularmente preferidos son los péptidos que tienen la secuencia de sec. con núm de ident.: 3 o de sec. con núm de ident.:8.

Tales péptidos pueden obtenerse por cualquiera de una variedad de métodos que incluyen por síntesis química o por medios recombinantes.

Las COPs y péptidos de la invención pueden proporcionarse en forma de polvo seco, pero también pueden proporcionarse en combinación con un portador o diluyente aceptables. Además, las composiciones pueden comprender además un adyuvante con un adyuvante preferido que es hidróxido de aluminio. Como tal, las composiciones pueden caracterizarse y usarse como una composición de vacuna.

También se proporcionan métodos de inmunoterapia específica (SIT) contra las alergias a polen de abedul, que comprenden administrar a un paciente con necesidad de este uno o más alérgenos seleccionados de del grupo que consiste en un primer péptido que comprende la secuencia desde el aminoácido 2 hasta los aminoácidos 42-52 de sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene; un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 42-52 para los aminoácidos 96-131 de la sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene y un tercer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 96-131 para el aminoácido 160 de la sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene.

Tales métodos pueden llevarse a cabo en los que los péptidos se administran mediante el uso de técnicas de inyección intradérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, transdérmica, intranasal, oral, sublingual, intraocular, o intratecales.

De acuerdo con uno de tales métodos, un paciente se trata con la combinación de cada uno de un primer péptido que comprende la secuencia desde el aminoácido 2 hasta los aminoácidos 42-52 de sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene; un segundo péptido que comprende la secuencia desde los aminoácidos 42-52 hasta los aminoácidos 96-131 de la sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene y un tercer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 96-131 para el aminoácido 160 de la sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene. De acuerdo con un método preferido, el primer y segundo péptidos se superponen entre sí por al menos 1 a 11 aminoácidos, mientras que el segundo y tercer péptidos se superponen entre sí por al menos 5-20 aminoácidos. De acuerdo con otra modalidad preferida el primer péptido consiste en la sec. con núm de ident.: 1, el segundo péptido consiste en la sec. con núm de ident.:2 y el tercer péptido consiste en la sec. con núm de ident.: 3 y de acuerdo con otra modalidad preferida el primer péptido consiste en la sec. con núm de ident.: 6, el segundo péptido consiste en la sec. con núm de ident.:7 y el tercer péptido consiste en la sec. con núm de ident.: 8.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la unión competitiva de COPs seleccionados a IgE en comparación con Bet v 1. Los COPs se preincuban con suero de sujetos alérgicos a polen de abedul ya sea en combinación (paneles A y D) o individualmente (paneles B y C). La IgE específica de Bet v 1 residual se controló mediante el uso de placas de ELISA recubiertas con r Bet v 1.

La Figura 2 representa los brazos derecho e izquierdo de un sujeto alérgico a polen de abedul que se describe en la sección de pruebas de punción cutánea (SPT). Las SPT se realizaron con varios COPs y sus combinaciones. La histamina se usó como control positivo. El polen de abedul y cantidades equivalentes de r Bet v 1 se ensayaron a tres concentraciones, mientras que los COPs se ensayaron en paralelo hasta una concentración 10 veces superior.

La Figura 3 representa los niveles de temperatura de los ratones inyectados con el alérgeno de polen de abedul. Una gran cantidad de r Bet v 1 se inyectó a los ratones sensibilizados (cuadrados rellenos) lo que resulta en la caída de la temperatura dentro de los 30 minutos. Los COPs seleccionados (T1, T2 y T3) que forman el producto AllerT (rombos blancos) no inducen una caída de la temperatura en los ratones sensibilizados.

La Figura 4 muestra la capacidad del r Bet v 1 para inducir la desgranulación de basófilos en un ensayo Basotest®. Los COPs no inducen la desgranulación de basófilos en cualquier concentración ensayada.

5 La Figura 5 representa el aumento de la IL-10 en PBMCs durante y hasta un mes de postratamiento. Las barras horizontales representan los valores medios de los resultados de los sujetos individuales (puntos).

10 La Figura 6 representa el incremento de IgG4 en el suero de los sujetos tratados con AllerT o un placebo durante y hasta mes de postratamiento. Las barras horizontales representan los valores medios de los resultados de los sujetos individuales (puntos).

15 La Figura 7 representa la temporada de polen 2009 en el área de Lausana, en correlación con las puntuaciones medias de un mini Cuestionario de Calidad de Vida de Rinoconjuntivitis. (RQLQ, Juniper, E. F., y otros, Clin. Exp. Allergy, 30: 132-140 (2000)).

15 Descripción detallada de la invención

La invención se describe a continuación a modo de ejemplos con referencia a los siguientes procedimientos experimentales y resultados.

20 Con el fin de seleccionar los productos con baja unión a IgE, tres conjuntos de largos (30-90 aminoácidos) péptidos contiguos superpuestos (COP) se diseñaron abarcando todo el alérgeno Bet v I, lo que proporciona de este modo todos los posibles epítomos de células T. Un primer conjunto abarca tres péptidos AllerT1, T2 y T3 con capacidad reducida para formar estructuras secundarias como se deriva de un análisis basado en los potenciales epítomos de IgE y la estructura terciaria de Bet v 1. Un segundo conjunto de tres COPs, AllerTβ, T7 y T8, se seleccionó. Un tercer grupo contenía dos COPs, AllerT4 - T5, que divide aproximadamente el alérgeno en dos partes con independencia de epítomos de IgE y la estructura terciaria. El primer y segundo conjuntos de péptidos se pusieron a prueba a través de una combinación de pruebas de competencia in vitro de IgE y pruebas de punción cutánea en humanos. La ausencia de reactividad a Bet v 1 se ensayó adicionalmente mediante el uso de ratones sensibilizados con Bet v 1, así como a través de la desgranulación de basófilos humanos. El primer conjunto, llamado AllerT, se usó más en los seres humanos para el tratamiento de sujetos alérgicos a polen de abedul.

30 Materiales y Métodos

35 *Alérgenos*

El Bet v 1 purificado recombinante se compró de BIOMAY (Viena, Austria). El extracto de polen de abedul, Aquagel SQ (ALK Wassrig SQ), se obtuvo de ALK Abello, Høshom, Dinamarca.

40 *Elección de péptidos y síntesis*

El objetivo fue evitar la formación de estructuras terciarias estables de epítomos de células B, mientras se presentan todos los epítomos de células T presentes dentro de la secuencia de Bet v 1. Como resultado, se seleccionó el siguiente primer conjunto de COPs que se superponen a lo largo de la secuencia de Bet v 1, concretamente:

45 Sec. con núm de ident.: 1
AllerT1: aa 2-50 de la sec. con núm de ident.: 9

GVFNYETETT SVIPAARLFK AFILDGDNLF PKVAPQAISS VENIEGNGG

50 pI/Mw Teórico: 4.36/5198.82

Sec. con núm de ident.: 2
AllerT2: aa 48-118 de la sec. con núm de ident.: 9

55 NGGP GTIKKISFPE GFPEKYVKDR VDEVDHTNFK YNYSVIEGGP IGDITLEKISN
EIKIVATPDG GSILKIS

pI/Mw Teórico: 5.72/7742.76

60 Sec. con núm de ident.: 3
AllerT3: aa 106-160 de la sec. con núm de ident.: 9

VATPDG GSILKISNKY HTKGDHEVKA EQVKASKEMG ETLRAVESY LLAHSDAYN

65 pI/Mw Teórico: 6.29/6001.72

Sec. con núm de ident.: 4

AllerT4: aa 2-85 de la sec. con núm de ident.: 9

5 GVFNYETETT SVIP AARLFK AFILDGDNLF PKVAPQAIS VENIEGNGGP GTIKKISFPE
GFPFKYVKDR VDEVDHTNFK YNYS

pI/Mw Teórico: 5.24/9348.49

Sec. con núm de ident.: 5

10 AllerT5: aa 65-160 de la sec. con núm de ident.: 9

FKYVKDR VDEVDHTNFK YNYSVIEGGP IGDITLEKISN EIKIVATPDG GSILKISNKY
HTKGDHEVKA EQVKASKEMG ETLRAVESY LLAHSDAYN

15 pI/Mw Teórico: 5.77/ 10759.06

Sec. con núm de ident.: 6

AllerT6: aa 2-49 de la sec. con núm de ident.: 9

20 GVFNYETETT SVIPAARLFK AFILDGDNLF PKVAPQAIS VENIEGNG

pI/Mw Teórico: 4.36 / 5141.77

Sec. con núm de ident.: 7

25 AllerT7: aa 44-118 de la sec. con núm de ident.: 9

NIEGNGG PGTIKKISFP EGFPFKYVKD RVDEVDHTNF KYNYSVIEGG PIGDTLEKIS
NEIKIVATPD GGSILKIS

30 pI/Mw Teórico: 5.24 / 8156.19

Sec. con núm de ident.: 8

AllerT8: aa 103-160 de la sec. con núm de ident.: 9

35 IKIVATPD GGSILKISNK YHTKGDHEVK AEQVKASKEM GETLLRAVES
YLLAHSDAYN

pI/Mw Teórico: 7.03 / 6356.22

40 Sec. con núm de ident.: 9

La secuencia de Bet v 1 como se publica bajo Swissprot PI 5494

45 MGVFNYETET TSVIPAARLF KAFILDGDNLF FPKVAPQAIS SVENIEGNGG PGTIKKISFP
EGFPFKYVKD RVDEVDHTNF KYNYSVIEGG PIGDTLEKIS NEIKIVATPD
GGSILKISNK YHTKGDHEVK AEQVKASKEM GETLLRAVES YLLAHSDAYN

50 Los ocho COPs se sintetizaron mediante química de fmoc en fase sólida a escala de investigación para permitir la determinación de la unión a IgE y las primeras pruebas con animales. La HPLC preparativa se uso para obtener más de 90 % de péptidos puros que se liofilizaron. Los péptidos se resuspendieron en agua a 2 mg/ml y se congelaron en alícuotas.

ELISA competitivo

55 El Bet v 1 recombinante a 0.5 µg/m (rBet v 1 obtenido de Biomay, Austria) se recubrió toda la noche en inmunoplasmas de 96 pocillos Nunc Maxisorp® (Life Technologies, Basel, Suiza). Después de bloquear con 1 % de BSA, se añadieron diez diluciones del suero del paciente. El Abm IgE anti-ratón de rata a 2 µg/ml (PharMingen), BD-Biosciences, San Dingo, CA) se añadió después y los anticuerpos se revelaron con fosfatasa alcalina acoplada con extravidina (Sigma Diagnostic Inc., St-Louis, MO, Estados Unidos). Los sueros de tres pacientes alérgicos se seleccionaron para alto nivel de IgE y clara señal sobre el fondo y se usaron para la prueba de competencia con los péptidos. Las diluciones en serie de cada COP, particularmente AllerT1, AllerT2, AllerT3, AllerT4, AllerT5, AllerT6, AllerT7 y AllerTδ, o mezclas de AllerT1-3, AllerT4-5 y AllerT6-8, comenzando en 10 µM, se preincubaron con los tres sueros seleccionados toda la noche a 4 °C. Los sueros se incubaron después en placas de 96 pocillos recubiertas con r Bet v 1 y la unión de IgE residual se determinó como se describió anteriormente, las diluciones de r Bet v 1 se usaron como control para la inhibición, mientras que la BSA se usó como control para la posible inhibición no específica.

65

Animales

Los ratones hembra BALB/c de cuatro semanas (H-2d) se obtuvieron de Harlan (AD Horst, Países bajos) y se usaron a la edad de 6-8 semanas. Ellos se mantuvieron en condiciones de alojamiento estándar con dieta libre de ovoalbúmina (OVA) y agua *ad libitum*.

5 *Protocolo de Inmunización*

Los ratones se sensibilizaron mediante inyecciones subcutáneas (s.c.) de concentraciones indicadas de r Bet v 1 (Biomay) que se adsorbieron en 2 mg de Alum (Sigma Chemicals, St-Louis, MO, Estados Unidos) en los intervalos indicados. Las inyecciones se hicieron en el abdomen y en la base de la cola de los ratones

10 *Isotipos de anticuerpos en ratones*

15 La cinética de respuesta de los anticuerpos IgE, IgG 1 e IgG 2a de suero se determinó por ELISA como se describió, (von Gamier, C. y otros, Eur J Immunol, 30(6): 1638-45 (2000) y Barbey, C. y otros, Clin Exp Allergy, 34(4):65462 (2004)). Brevemente, las inmunoplasmas de 96 pocillos Nunc Maxisorp® (Life Technologies, Basel, Suiza) se recubrieron con 5 mg/ml de r Bet v 1. Después de bloquear con 1 % de BSA, las diluciones óptimas de suero de ratón se añadieron, particularmente 1:5 para IgE, 1:500,000 para IgG 1, 1: 1,000 para IgG 2a respectivamente. El Abm IgE anti-ratón de rata a 2 mg/ml (PharMingen, BD Biosciences, San Diego, CA); o IgG 1 anti-ratón policlonal purificado de cabra diluido 1:3000 (Caltag, WBAG Resources, Zurich, Suiza); o IgG 2a anti-ratón policlonal purificado de cabra diluido 1:3000 (Caltag) se añadieron como anticuerpos secundarios y se revelaron con fosfatasa alcalina (Sigma Diagnostic Inc., St-Louis, MO, Estados Unidos). Para los isotipos de IgE, la IgE purificados de ratón (21-1 A, PharMingen) se usó como estándar en micropocillos recubiertos con IgE anti-ratón de rata (R35-72, PharMingen) a 2 mg/ml. Los resultados se expresaron en ng/ml como unidades arbitrarias.

25 *Pruebas de desgranulación de basófilos*

30 Basotest® (ORPEGEN Pharma Heidelberg, Alemania) se usó para la determinación cuantitativa de desgranulación in vitro de basófilos. La sangre heparinizada (100 µl) de donante alérgico al polen de abedul se incubó primero con tampón de estimulación durante 20 minutos a 37 °C, y después con o sin péptido quimiotáctico formilmetionilleucilfenilalanina (fMLP) como controles positivos y negativos respectivamente. Las alícuotas de sangre se incubaron en paralelo con 100 µl de solución de alérgeno diluido en una solución salina durante 20 minutos a 37 °C. Una curva de dosis respuesta se realizó con 25, 2.5, 0.25, 0.025 y 0.0025 nanomolar de r Bet v 1, así como también a partir de 10 veces superior con mezclas AllerT (AllerT1-T3, AllerT4-5 y AllerT6-8). El proceso de activación se detuvo mediante la incubación de las muestras de sangre a 4 °C durante 10 minutos. A continuación, las muestras se incubaron durante 20 minutos a +4 °C con 20 µl de anti-IgE conjugado con ficoeritrina (PE) y anti-gp53 (CD63) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), los eritrocitos se eliminaron posteriormente mediante la adición de 2 ml de solución de lisis (Becton-Dickinson). Las células se lavaron dos veces con solución de PBS y se resuspendieron en 200 µl de solución de PBS y se analizaron en 1 hora por citofluorimetría (FASCalibur, BectonDickinson). La población de basófilos se enfrentó a las células PE positivas para anti-IgE y la expresión de gp53 (CD63), se analizó en esta población. La adquisición se realizó en 1,000 células para cada muestra y los resultados se dan como el porcentaje de basófilos (células positivas para IgE) que expresan gp53 (CD63). La desgranulación positiva se fijó en un punto de corte de 15 % de células positivas para IgE que expresan CD63 de acuerdo con la notificación de Basotest®.

45 *Pruebas de punción cutánea de pacientes alérgicos*

50 Se seleccionaron veinte voluntarios que sufren de rinoconjuntivitis o asma estacional durante el período de polenosis de abedul, que incluyen siete machos y trece hembras con una media de edad que fue de 30.1 años (intervalo 23-45 años). Todos los sujetos reaccionaron a extractos de polen de abedul (Aquagen SQ), y a r Bet v 1 (Biomay) mediante pruebas de punción cutánea estándar (SPT). La reactividad serológica (anticuerpos IgE) también fue positiva para polen de abedul y Bet v 1 como se determinó por CAP-RAST. La respuesta alérgica de los péptidos se evaluó in vivo mediante la SPT con cada uno de los 5 péptidos (AllerT1, AllerT2, AllerT3, AllerT4 y AllerT5) y con los 2 conjuntos (AllerT1-3 y AllerT4-5) en todos los pacientes. Para cada péptido, se aplicó una gota de 20 µl en el antebrazo a 3 concentraciones diferentes (10, 1 y 0.1 µM). El extracto del polen de abedul (Aquagen SQ, ALK-Abelló) y Bet v 1 (Biomay) se probaron además con SPT a 3 concentraciones 10 veces más baja que la usada para los péptidos, es decir 100,000, 10,000 y 1,000 SQ para polen de abedul así como 1, 0.1 y 0.01 µM para Bet v 1. El diámetro de la roncha se evaluó tomando el diámetro máximo. La SPT se consideró positiva cuando el diámetro de la roncha era de 4 mm o más con un eritema (Hoffmann, A. y otros, J Allergy Clin Immunol, 99(2):227-32 (1997)). Las reacciones que resultan en un diámetro de la roncha inferior a 4 mm, aunque superior a 2 mm, también se registraron y se clasifican como "dudosa".

60 *Resultados experimentales*

Elección de péptidos

65 Bet v 1 es una proteína madura de 159 aminoácidos después de la remoción de la primera metionina (NCBI X1 5877, Swissprot P 15494) y está presente en diferentes isoformas en los granos de polen de abedul (Schenk, M.F. y otros,

BMC Genomics, 7:168 (2006)). Además, la familia Bet v 1 muestra una homología de secuencia con algunos alérgenos de alimentos como el apio (NCBI: Estructura IBTV, 1FM4_A, 2BKO_A). Una fuerte reacción alérgica cruzada se documenta entre las especies Fagales (abedul, avellana, aliso y el carpe). La comparación de secuencias Bet v 1 entre estas especies mostró regiones de conservación de secuencia particularmente elevada que representan candidatos por ser los epítomos de células B responsables de la reacción alérgica tal como se propone por Spangfort et al. (Spangfort, M.D. y otros, Int Arch Allergy Immunol, 113(1-3):243-5 (1997)). Tres regiones de sec. con núm de ident.: 9 pueden proponerse para unión a IgE, concretamente, una primera región, epítomo B1, desde aminoácidos (aa) 97-122 combinado con aa 132-142; una segunda región, epítomo B2, que abarca aa 16-24 en combinación con aa 143-155; y una tercera región, epítomo B3 que contiene el lazo con homología a la secuencia GXGXXG de unión a GTP situada en aa 42-53. Por otro lado, los epítomos de células T se encuentran dispersas en la secuencia de Bet v 1, excepto para los aminoácidos 49-60, que contiene el sitio de unión GTP potencial GXGXXG.

Los epítomos potenciales pueden predecirse mediante el uso de herramientas computacionales para la predicción de epítomos como se propone en los recursos de bases de datos y análisis de epítomos inmunes (IEDB) (<http://immuneepitope.org/>). Particularmente, ElliPro predice epítomos de anticuerpos lineales y discontinuos basados en la estructura 3D de un antígeno proteico. Dentro de los epítomos lineales pronosticados por ElliPro, se encontró un epítomo potencial que se corresponde con el epítomo B3 (lazo 41-52) pronosticado por Spangfort et al. Tres epítomos discontinuos se pronosticaron por ElliPro los cuales diferían de los propuestos por Spangfort y otros. 1997. El primero incluye los aa 1-4 combinados con los aa 123-126; el segundo incluye aa 92-95 con el aminoácido 127; el tercero incluye aa 10-15 con aa 106-114.

La combinación de los conocimientos sobre la proteína madura al faltar el primer residuo y la predicción de un epítomo lineal potencial entre los aminoácidos 42 a 53, el primer COP tiene que comenzar en el aminoácido 2 y terminar entre los aa 42 y 52. El segundo COP tiene que comenzar entre los aminoácidos 42 y 52, para evitar la formación del epítomo lineal original, y que pueda tener una superposición con el primer COP. La extensión de la superposición se determina por el hecho de que ningún epítomo de células T se encuentra dentro de la región de aa 49-60. Así, la superposición puede variar desde un mínimo de 0 si el extremo del primer COP está entre los aminoácidos 49 y 53, hasta un máximo de 11 si el extremo del primer COP está entre el aa 42 y 48. El extremo del segundo COP tiene que ser colocado entre el aa 96 y 131 para prevenir la formación de epítomo B1, así como también el segundo epítomo predicho por ElliPro anteriormente citado. El inicio del tercer COP tiene que estar situado entre el aa 96 y 131 por las razones citadas anteriormente para prevenir la formación de epítomo de células B. Las superposiciones puede variar de 5 a 20 aminoácidos para proporcionar todos los posibles epítomos de células T.

En base a la secuencia P 15494 (Swissprot), usada por otros en forma recombinante para los ensayos clínicos (Pauli, G. y otros, J Allergy Clin Immunol, 122(5):951-60 (2008)), y las predicciones anteriores, se diseñaron tres conjuntos de péptidos que abarcan la secuencia completa de Bet v 1. Los conjuntos AllerT1, -T2 y -T3 (sec. con núm de ident.: 1, 2 y 3 respectivamente), así como AllerT6, -T7 y -T8 (sec. con núm de ident.: 6, 7 y 8, respectivamente), se diseñaron de acuerdo con la regla descrita anteriormente, concretamente posee puntos finales y superposiciones que previenen la formación de los epítomos discontinuos de células B predichos. Particularmente, los péptidos se superponen en sus extremos por los aminoácidos 3 y 13 entre AllerT1-AllerT2 y AllerT2-AllerT3 respectivamente. Las superposiciones son de 6 y 16 aminoácidos respectivamente, entre AllerT6-AllerT7 y AllerT7-AllerT8 respectivamente. Otro conjunto de los COPs, concretamente AllerT4-T5 se eligió sin tomar en cuenta las predicciones anteriores y se compone de sólo dos péptidos que se superponen por 21 aminoácidos. Los epítomos B1 y B3, anteriormente mencionados, están totalmente presentes en AllerT5 y AllerT4 respectivamente, mientras que el segundo epítomo discontinuo predicho por ElliPro está presente en AllerT5. Todos los péptidos contiguos superpuestos (COPs) se usaron por separados o mezclados en cantidades equimolares en experimentos adicionales.

Unión a IgE de los COPs seleccionados comparado r Bet v 1

Los COPs se probaron in vitro para la reducción de la unión IgE por ELISA competitivo como se describe en materiales y métodos. Como se ve en la Fig. 1, r Bet v 1 compitió con IgE presente en el suero a concentraciones que van desde 10^{-10} a 10^{-5} M (50 % de inhibición) en dependencia del suero del donante, mientras que BSA no mostró inhibición detectable en todas las concentraciones ensayadas. Los Aller T1, T2 y T3 ya sean solos (Fig. IB) o en combinación equimolar (Fig. IA) no mostraron competencia. El mismo resultado se obtuvo con péptidos seleccionados de acuerdo con las mismas reglas, concretamente AllerT6, T7 y T8 (Fig. ID). Los Aller T4 y T5 solo mostraron un resultado comparable (Fig. 1C), mientras que, sorprendentemente, la combinación de Aller T4 con Aller T5 mostró algo de inhibición, aunque al menos 1,000 veces la concentración más alta que r Bet v 1 (Figs. 1A y C). Los ensayos de competencia se llevaron a cabo con sueros de tres pacientes alérgicos, lo que confirma la ausencia de competencia de los conjuntos combinados AllerT1, T2 y T3, así como AllerT6, T7 y T8 con Bet v 1 para la unión IgE (datos no mostrados).

Efecto de los COPs seleccionados en ratones sensibilizados con Bet v 1

Una primera serie de ratones se trataron de acuerdo con el protocolo desarrollado por Hufnagl, K. y otros, J Allergy CHn Immunol, 116(2):370-6 (2005), concretamente, mediante tres inyecciones intraperitoneales (i.p.) y se retaron mediante aerosol de polen del árbol, de forma manual, IgE contra Bet v 1 fue indetectable después del periodo de

inyección, lo que indica que los ratones no se sensibilizaron. De acuerdo con ello, falló el reto del polen del árbol en aumentar la presencia de eosinófilos en el lavado del fluido bronquial (datos no mostrados). De este modo se aplicó el protocolo de sensibilización usado en los estudios murinos anteriores para PLA2 del veneno de abeja (von Gamier, C. y otros, Eur J Immunol, 30(6):1638-45 (2000)). Los ratones se sensibilizaron mediante seis inyecciones subcutáneas de r Bet v 1 en hidróxido de aluminio a intervalos de 2 semanas. Se ensayaron concentraciones que van de 0.1 a 10 µg. Interesantemente, la IgE específica a Bet v 1 aumentó significativamente sólo después de la cuarta inyección en ratones sensibilizados con 0.1 mg, lo que puede explicar por qué falló el experimento anterior. Los niveles de IgG2 (correspondientes a IgG4 protectora en humanos) comenzaron a aumentar después de la 4ta inyección y aumentaron de forma constante a partir de entonces, mostrando un máximo después de 6 inyecciones. IgG2a específica a Bet v 1 parecía aumentar ligeramente más tarde que los niveles de IgE específica.

La sensibilización de los ratones se probó mediante inyección i.p. de una dosis alta (30 µg) de r Bet v 1 y se registra la temperatura rectal. Como se ve en la Fig. 3, se observa una caída de temperatura dentro de los 30 minutos posteriores a la inyección de r Bet v 1 que muestra una fuerte respuesta alérgica sistémica. La inyección de 150 µg de AllerT no dio lugar a un cambio de temperatura, lo que indica un incremento de la seguridad del enfoque basado en el COP por encima de r Bet v 1, al menos en los animales. No se observa ninguna diferencia significativa entre los ratones sensibilizados con 0.1, 1.0 o 10 µg de r Bet v 1 (datos no mostrados). Por lo tanto, los ratones sensibilizados con r Bet v 1 no mostraron una disminución de la temperatura cuando se enfrentan a AllerT, lo que se asemeja a una prueba de choque anafiláctico en humanos.

Ensayos de desgranulación de basófilos

Con el fin de verificar aún más la seguridad de AllerT, los COPs se pusieron a prueba en un ensayo de desgranulación de basófilos (Basotest®). Los basófilos son desgranulados cuando se estimulan con r Bet v 1 de una manera dependiente de la concentración (Fig. 4). Por el contrario, los COPs individuales (AllerT1 a AllerT8) y combinaciones son incapaces de inducir la desgranulación por encima del nivel observado con un control negativo. No se observó desgranulación a través de un intervalo de concentraciones de COPs hasta 1,000 veces que la concentración de Bet v 1 capaz de inducir la desgranulación media máxima (Fig. 4). La ausencia de desgranulación de basófilos indica un riesgo potencialmente reducido de reacción alérgica inmediata tras la aplicación en humanos.

Ensayos de pruebas de punción cutánea (SPT)

Las SPT con los COPs AllerT se realizaron en 20 voluntarios los que presentan síntomas de rinitis alérgica confirmados ya sea por un CAP RAST positivo y/o por reacción cutánea positiva al polen de abedul (Tabla I). Como era de esperar, las SPT fueron positivas en todos los voluntarios, ya sea con extractos de polen de abedul o Bet v 1 recombinante en concentraciones de 100,000 de SQ y 1 µM respectivamente (Tabla II A). A concentraciones más bajas, 80 a 85 % de los sujetos mostraron reacción positiva a una dilución de 10 veces, mientras que de 5 a 10 % de los sujetos mostraron reactividad a una dilución de 100 veces de polen de abedul o r Bet v 1. Las concentraciones de los péptidos tan elevadas como 10 veces con respecto a r Bet v 1 se ensayaron (hasta 10 µM). Ninguno de los COPs mostró reacciones cutáneas positivas por encima del umbral definido, concretamente, un diámetro superior de 4 mm de la roncha con eritema (ejemplo de los brazos de un sujeto en la Fig. 2).

Tabla I: Características de los sujetos

	Sujetos
Cantidad de sujetos	20
Edad media (intervalo)	30.1 años (23 - 45)
Machos / hembras	7 / 13
Asma	7
Rinitis	20
Flujo máximo (% valor predictivo)	93.75 L/min (61-117)
IgE abedul (kU/L) (intervalo)	29.34 (0.7 - 100)
IgE Bet v 1 (kU/L) (intervalo)	29.48 (0.35 - 100)

Tabla II. A: Resultados de los ensayos de pruebas de punción cutánea

Reacciones cutáneas positivas:				
	Diluciones			
	1:1	1:10	1:100	
5	Abedul (100'000 SQ)	20	17	1
	r Bet v 1 (1µM)	20	16	2
10	AllerT1 (10µM)	0	0	0
	AllerT2 (10µM)	0	0	0
	AllerT3 (10µM)	0	0	0
15	Mezcla AllerT1-3 (10µM)	0	0	0
	AllerT4 (10µM)	0	0	0
	AllerT5 (10µM)	0	0	0
20	Mezcla AllerT4-5 (10µM)	0	0	0

Las reacciones de la piel por debajo del umbral definido se observaron ocasionalmente en algunos sujetos. Tales reacciones dudosas se anotaron cuando se observa un edema con roncha detectable por debajo de 4 mm con o sin eritema (Tabla II B). Tales reacciones se observaron con baja concentración ya sea de polen de abedul o r Bet v 1 (datos no mostrados). Las pruebas de punción cutánea pueden provocar irritaciones locales independientes de los productos en algunos sujetos. De hecho, una reacción más baja que el umbral definido se registró esporádicamente en uno u otro voluntario. Suponiendo reacciones tales como antecedente, la precaución estadística lleva a definir las reacciones dudosas en más de tres sujetos como posiblemente significativo. La combinación Aller T4-T5 provocó reacciones en 6 voluntarios en la concentración más alta (Tabla II B) lo que confirma por tanto su capacidad baja pero significativa de unirse IgE observada en ELISA competitivo.

Tabla II B: Punción cutánea por debajo del umbral (dudosa)

Reactividad menor que el umbral definido:				
	Diluciones			
	1:1	1:10	1:100	
35	AllerT1 (10µM)	2	0	0
40	AllerT2 (10µM)	0	0	0
	AllerT3 (10µM)	0	1	0
	Mezcla AllerT1-3 (10µM)	0	0	0
45	AllerT4 (10µM)	0	0	1
	AllerT5 (10µM)	1	0	0
50	Mezcla AllerT4-5 (10µM)	6	0	1

Estudio de toxicología en ratones

Los péptidos contiguos superpuestos (COPs) han demostrado una excelente seguridad en pacientes alérgicos al veneno de abejas (Fellrath y otros, J Allergy Clin. Immunol, 111 :854-861 (2003)). Las respuestas inmunológicas se parecieron a los obtenidos cuando se aplica SIT, lo que indica, pero no demuestra, una posible eficacia. La aplicación del mismo enfoque a la alergia al polen de abedul se presenta aquí. Sorprendentemente, un conjunto de COP derivados de la secuencia de Bet v 1 mostró unión residual a IgE. Dado que los péptidos que componen este conjunto, concretamente AllerT4 y AllerT5, ellos mismos no muestran tal unión, una interacción de los dos péptidos en solución es la causa más probable de la aparición de un epítipo de células B reconocido por IgE. Tal unión residual se observó en ensayos de competencia con los sueros de dos pacientes así como también en 6 voluntarios analizados por pruebas cutáneas. Queda por demostrar si la mezcla AllerT4-T5 resulta en pocas moléculas con la conformación original de Bet v 1 o si el epítipo de células B reconstruido se reconoce parcialmente por IgE con baja afinidad. Los dos conjuntos de COPs combinando Aller T1, T2 y T3 en un lado y AllerT6, T7 y T8 en el otro lado, no muestran ninguna unión de IgE detectable mediante el uso ya sea de ELISA competitivo, ensayos de desgranulación o por pruebas de punción cutánea.

Por lo tanto, se puede esperar que la combinación de AllerT1, T2 y T3, llamada AllerT, no provoque respuestas alérgicas mediadas por IgE en humanos.

5 Un estudio toxicológico regulador se llevó a cabo en ratones por la CERB (Francia) para preparar el ensayo clínico en humanos. En el estudio participaron 40 animales divididos en 2 grupos de 10 machos y 10 hembras, uno dosificado con el vehículo, concretamente hidróxido de aluminio, y el otro dosificado con AllerT (una mezcla equimolar de COPs AllerT1, AllerT2 y AllerT3) a 40 µg/animal. La asignación de cada animal al tratamiento se determinó al azar antes del inicio del estudio. La homogeneidad de los grupos fue validado en el criterio de peso corporal medido en el día de la aleatorización, de forma separada para machos y hembras. La dosis de 40 µg por animal corresponde a un cuarto de la dosis de mantenimiento que se prevé usar en humanos (160 µg). AllerT o sus vehículos se administraron en los días 1, 4, 8, 12 y 26 en aproximadamente el mismo período del día, por vía subcutánea. Para cada administración, se administra por animal 200 µl de AllerT o del vehículo. No se observa mortalidad en los animales dosificados ya sea con el vehículo o con AllerT. No se observan cambios en el consumo de alimentos o el peso corporal.

15 Durante las observaciones generales, no se observan signos clínicos en los animales tratados con el vehículo o con AllerT. No se observan efectos sobre los parámetros hematológicos y de coagulación en los ratones dosificados con AllerT, en comparación con el grupo de vehículo. No se observan efectos sobre los parámetros de química clínica o en el análisis de orina en los animales dosificados con AllerT, cualquiera sea el sexo. No se observan anomalías atribuidas al vehículo o a AllerT en los órganos examinados en la necropsia. Por lo tanto no se atribuye mortalidad al tratamiento con AllerT a 40 µg/animal, en las condiciones experimentales adoptadas, y no se observan señales de toxicidad. A excepción de los cambios histológicos en el sitio de la inyección debido al uso del adyuvante hidróxido de aluminio, no se observan cambios anatómicos e histológicos en los órganos propensos a ser el objetivo de los tratamientos con péptidos o productos recombinantes. Una prueba de inmunogenicidad limitada mostró que, como se esperaba, la inyección AllerT induce tanto IgG específica, que incluye IgG2, en ratones.

25 *Tratamiento de los sujetos humanos con AllerT en un ensayo clínico fase IIIa*

Se llevó a cabo un ensayo clínico unicéntrico fase I/IIa, aleatorizado, controlado con placebo en Lausana (Suiza), que incluye voluntarios con rinitis alérgica y asma a polen de abedul para evaluar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia potencial de AllerT, basados en péptidos contiguos superpuestos (COPs) derivados de Bet v 1, el principal alérgeno del polen de abedul. Antes de la temporada del polen, AllerT en el adyuvante de hidróxido de aluminio se inyectó por vía subcutánea a 15 voluntarios adultos (18-45 años) en el día 0, día 7, día 14, el día 21 y el día 51. Los voluntarios de control (n = 5) recibieron únicamente hidróxido de aluminio como placebo. Los criterios de valoración inmunológicos y/o pruebas de seguridad biológica se llevaron a cabo después de cada visita, hasta un mes después del tratamiento. Durante la temporada del polen de abedul del 2009, los voluntarios se evaluaron sobre la base de los 32 artículos del Cuestionario de Calidad de Vida (MiniRQLQ) y Rinitis y en los síntomas de asma.

40 En general AllerT fue seguro y todos los sujetos completaron el protocolo de inyección. Los eventos adversos locales fueron leves y no fueron diferentes del placebo. No se informaron eventos adversos graves, reacciones alérgicas inmediatas y valores de laboratorio anormales clínicamente significativos relacionados con AllerT. En el grupo activo, AllerT indujo una respuesta celular inmune temprana vigorosa específica a Bet v 1, marcada por INFγ a asociado a vacuna y aumento de más de 5 veces en la secreción de IL-10 como se discriminó en PBMCs (Fig. 5). Esto contribuyó a un aumento de al menos 10 veces en el aumento del nivel de IgG4 específico para anti-Bet v 1 (Fig. 6), mientras que la respuesta de IgE fue limitada. Durante la temporada de exposición, se observa una marcada mejoría general en la puntuación de los síntomas de MiniRQLQ y asma en comparación con el placebo. Así, la inmunoterapia con una mezcla de tres COPs derivados de Bet v 1 (AllerT) fue segura e inmunogénica en voluntarios con rinitis alérgica y asma al polen de abedul, y dio lugar a una marcada mejoría de los síntomas estacionales y calidad de vida (Fig. 7).

50 A partir de estos experimentos se puede concluir que Aller T, una combinación de los tres péptidos Aller T1, T2 y T3, representa un mejor candidato para el tratamiento de la alergia al polen de abedul que la combinación de Aller T4 y T5. También se contemplan homólogos de los COPs Aller T1, T2 y T3, por cambios de aminoácidos dentro de cada péptido para producir homólogos de estos en donde se elimina la reactividad de los homólogos a anticuerpos IgE de los pacientes que son alérgicos a polen de abedul, mientras que con los linfocitos T aún se mantiene. Además se contemplan homólogos de los COPs desplazando los límites de las COPs en Bet v1 importante alérgeno del polen de abedul. Tales homólogos resultarán en productos con perfiles equivalentes de unión a IgE no detectable y la actividad de linfocitos T. Tales productos presentarán el mismo potencial para la seguridad y la eficacia en humanos como Aller T y pueden considerarse como equivalentes en términos de posibilidades de tratamiento, a menos que se indique lo contrario. Los homólogos adecuados caracterizados por ninguna reactividad contra anticuerpos IgE de polen de abedul mientras se mantiene la reactividad con los linfocitos T pueden identificarse por los métodos descritos en la presente descripción.

60 Numerosos tratamientos y variaciones en la práctica de la invención se prevé se susciten a aquellos expertos en la materia tras la consideración de las modalidades actualmente preferidas de esta. En consecuencia, las únicas limitaciones que se debe colocar sobre el alcance de la invención son las que aparecen en las reivindicaciones adjuntas.

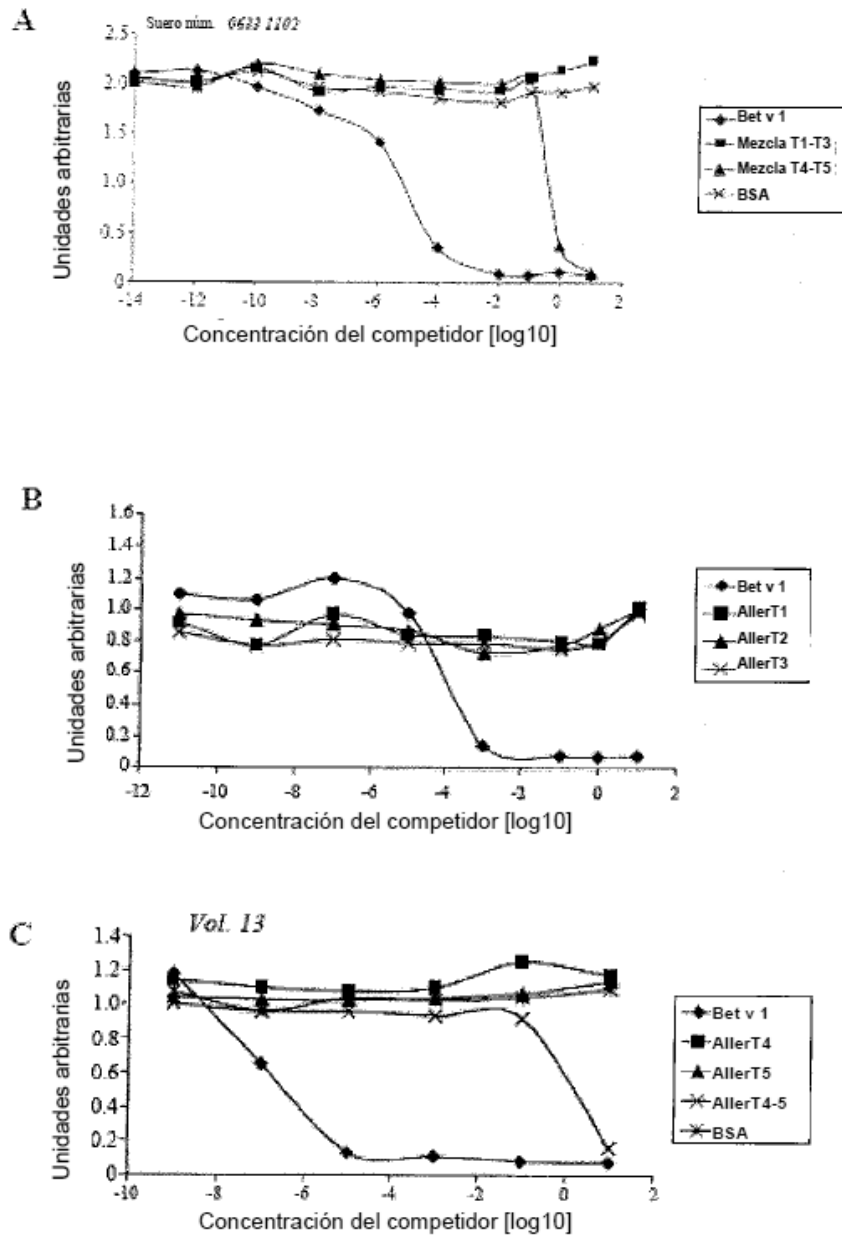
65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una pluralidad de fragmentos de péptidos contiguos superpuestos que comprende un primer péptido que comprende la secuencia desde el aminoácido 2 hasta los aminoácidos 42-52 de sec. con núm. de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene; un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 42-52 para los aminoácidos 96-131 de la sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene y un tercer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 96-131 para el aminoácido 160 de la sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene.
2. La composición de la reivindicación 1 en donde el primer y segundo péptidos se superponen entre sí por 1 a 11 aminoácidos.
3. La composición de la reivindicación 1 en donde el primer y segundo péptidos se superponen entre sí por 5 a 20 aminoácidos.
4. La composición de la reivindicación 1 que comprende una combinación del péptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 1, el péptido que tiene sec. con núm. de ident.: 2 y el péptido que tiene la sec. con núm de ident.: 3.
5. La composición de la reivindicación 1 que comprende una combinación del péptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 6, el péptido que tiene la sec. con núm de ident.: 7 y el péptido que tiene la sec. con núm de ident.: 8.
6. Un péptido que consiste en la secuencia desde el aminoácido 2 hasta los aminoácidos 42-52 de sec. con núm. de ident.: 9, o un péptido que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con un péptido que consiste en la secuencia desde el aminoácido 2 hasta los aminoácidos 42-52 de sec. con núm. de ident.: 9, en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene.
7. El péptido de la reivindicación 6 que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1.
8. El péptido de la reivindicación 6 que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 6.
9. Un péptido que comprende la secuencia desde los aminoácidos 42-52 para los aminoácidos 96-131 de sec. con núm de ident.: 9, o un péptido que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con un péptido que comprende la secuencia desde los aminoácidos 42-52 hasta los aminoácidos 96-131 de sec. con núm. de ident.: 9, en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene.
10. El péptido de la reivindicación 9 que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 2.
11. El péptido de la reivindicación 9 que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 7.
12. Un péptido que consiste en la secuencia desde los aminoácidos 96-131 hasta el aminoácido 160 de sec. con núm. de ident.: 9, o un péptido que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con un péptido que consiste en la secuencia desde los aminoácidos 96-131 hasta el aminoácido 160 de sec. con núm. de ident.: 9, en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene.
13. El péptido de la reivindicación 12 que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 3.
14. El péptido de la reivindicación 12 que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 8.
15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que se proporciona en forma de polvo seco.

16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 9 o 12 que comprende además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 5 17. La composición de la reivindicación 16 que comprende además un adyuvante.
- 10 18. Uno o más alérgenos seleccionado del grupo que consiste en un primer péptido que consiste en la secuencia desde el aminoácido 2 hasta aminoácidos 42-52 de sec. con núm. de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a los anticuerpos IgE de los sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras que la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene; un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 42-52 para los aminoácidos 96-131 de la sec. con núm de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a anticuerpos IgE de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene; un tercer péptido que consiste en la secuencia desde aminoácidos 96-131 hasta el aminoácidos 160 de sec. con núm. de ident.: 9 en donde la reactividad de dicho péptido a anticuerpos IgE de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se elimina mientras la reactividad con los linfocitos T de sujetos que son alérgicos a polen de abedul se mantiene, para uso en inmunoterapia específica contra alergias a polen de abedul.
- 15 19. El uno o más alérgenos para usar de conformidad con la reivindicación 18 en donde los péptidos están en una forma adecuada para técnicas de inyección intradérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, transdérmica, intranasal, oral, sublingual, intraocular, o intratecal.
- 20 20. Una composición que comprende una pluralidad de fragmentos de péptidos contiguos superpuestos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para usar en inmunoterapia específica contra alergias al polen de abedul.
- 25

Figura 1: Unión reducida a IgEde COPs seleccionados comparado con Bet v 1



D

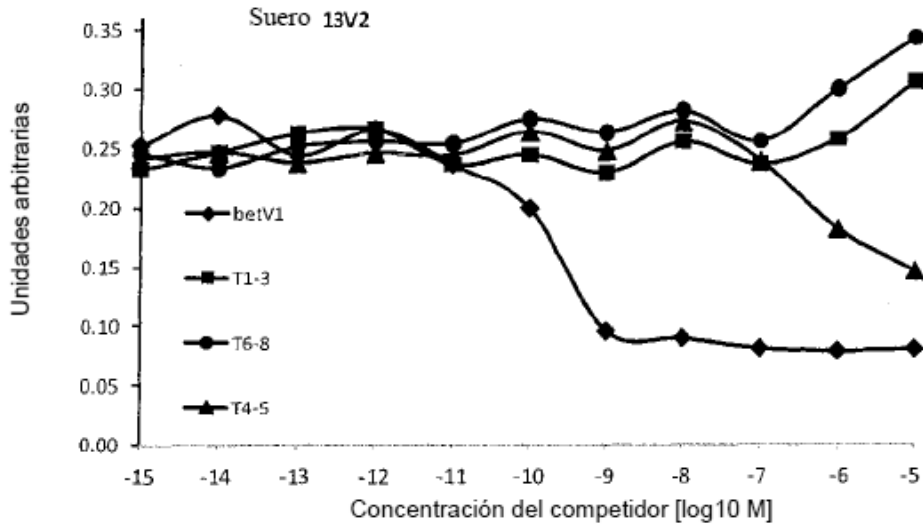


Figura2: Prueba de punción cutánea

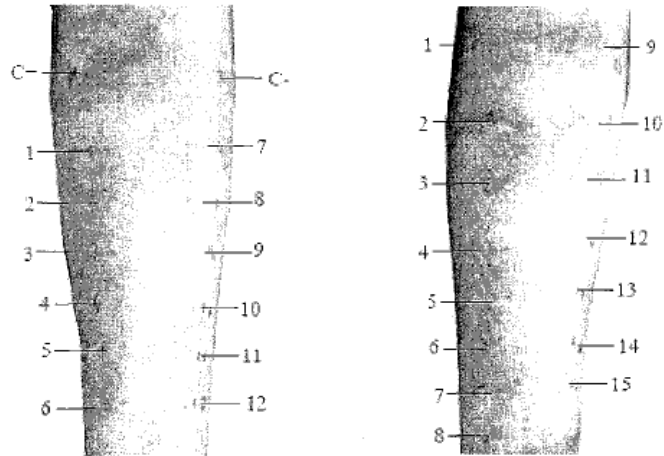


Figura 2

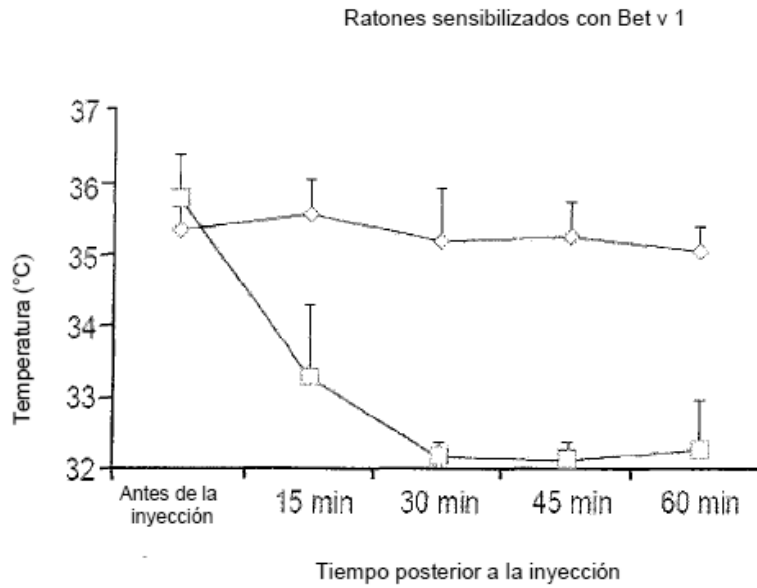
A:

C+Histamina ; 1: AllerT1(10 μ M); 2: AllerT1 (1 μ M); 3: AllerT1 (0.1 μ M); 4: AllerT3(10 μ M); 5: AllerT3 (1 μ M); 6: AllerT3 (0.1 μ M); C-: Control negativo ; 7: AllerT2(10 μ M); 8: AllerT2 (1 μ M); 9: AllerT2 (0.1 μ M); 10: AllerT1-3 (10 μ M); 11: AllerT1-3 (1 μ M); 12: AllerT1-3 (0.1 μ M).

B:

1: rBet v 1 (1 μ M); 2: rBet v 1 (0.1 μ M); 3: rBet v 1 (0.01 μ M); 4: AllerT4 (10 μ M); 5: AllerT4 (1 μ M) 6: AllerT4 (0.1 μ M); 7: AllerT4-5 (10 μ M); 8: AllerT4-5 (1 μ M); 9: Abedul (100'000SQ); 10: Abedul (10'000SQ); 11: Abedul (1000SQ); 12: AllerT5 (10 μ M); 13: AllerT5 (1 μ M); 14: AllerT5 (0.1 μ M); 15: AllerT4-5 (1 μ M)

Figura 3 Caída de Temperatura inducida por el alérgeno en ratones sensibilizados



Leyenda: Cuadrados= Bet v 1; Rombos= AlletT

Figura 4: AllerT no induce desgranulación de basófilos

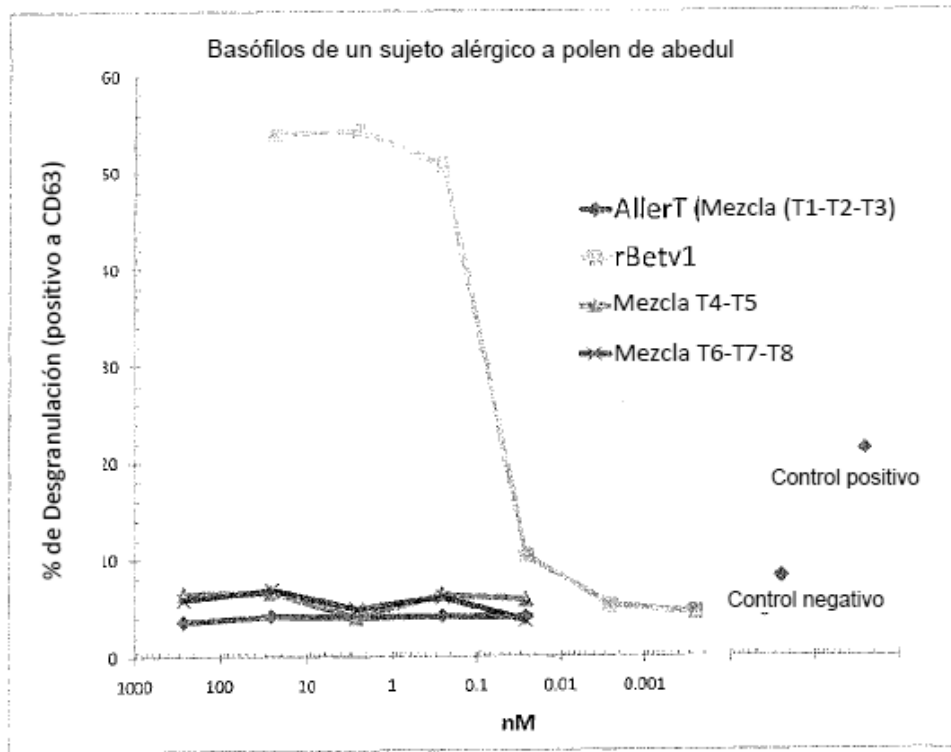


Figura 5: Inducción de IL-10 en sujetos alérgicos tratados con AllerT

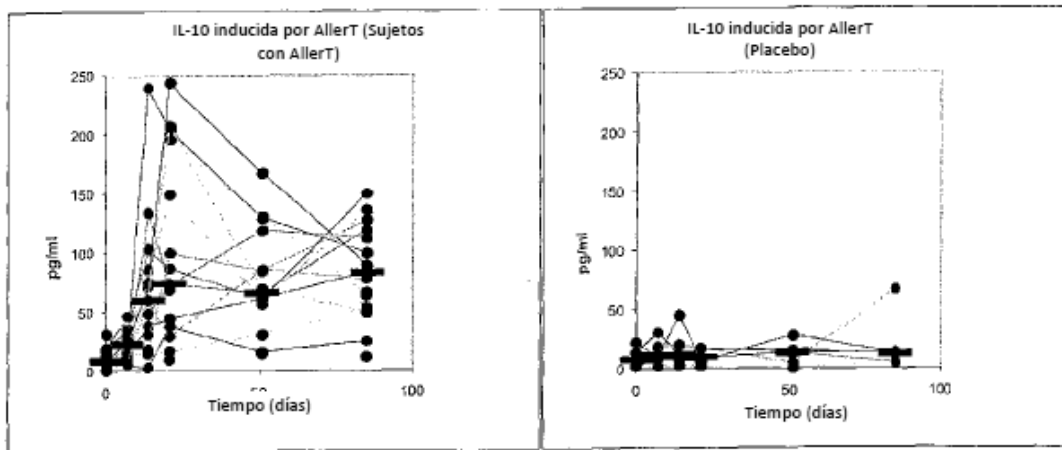
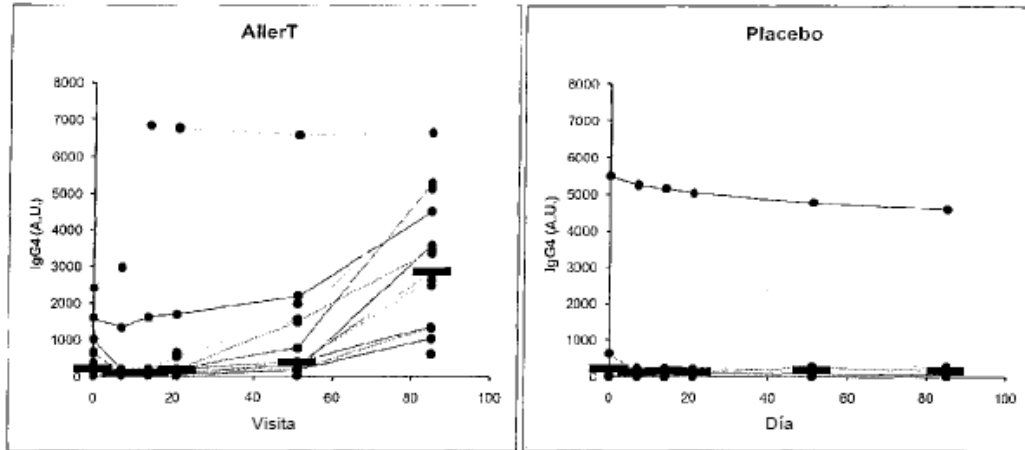


Figura 6: Aumento en IgG4 como un resultado del tratamiento con AllerT



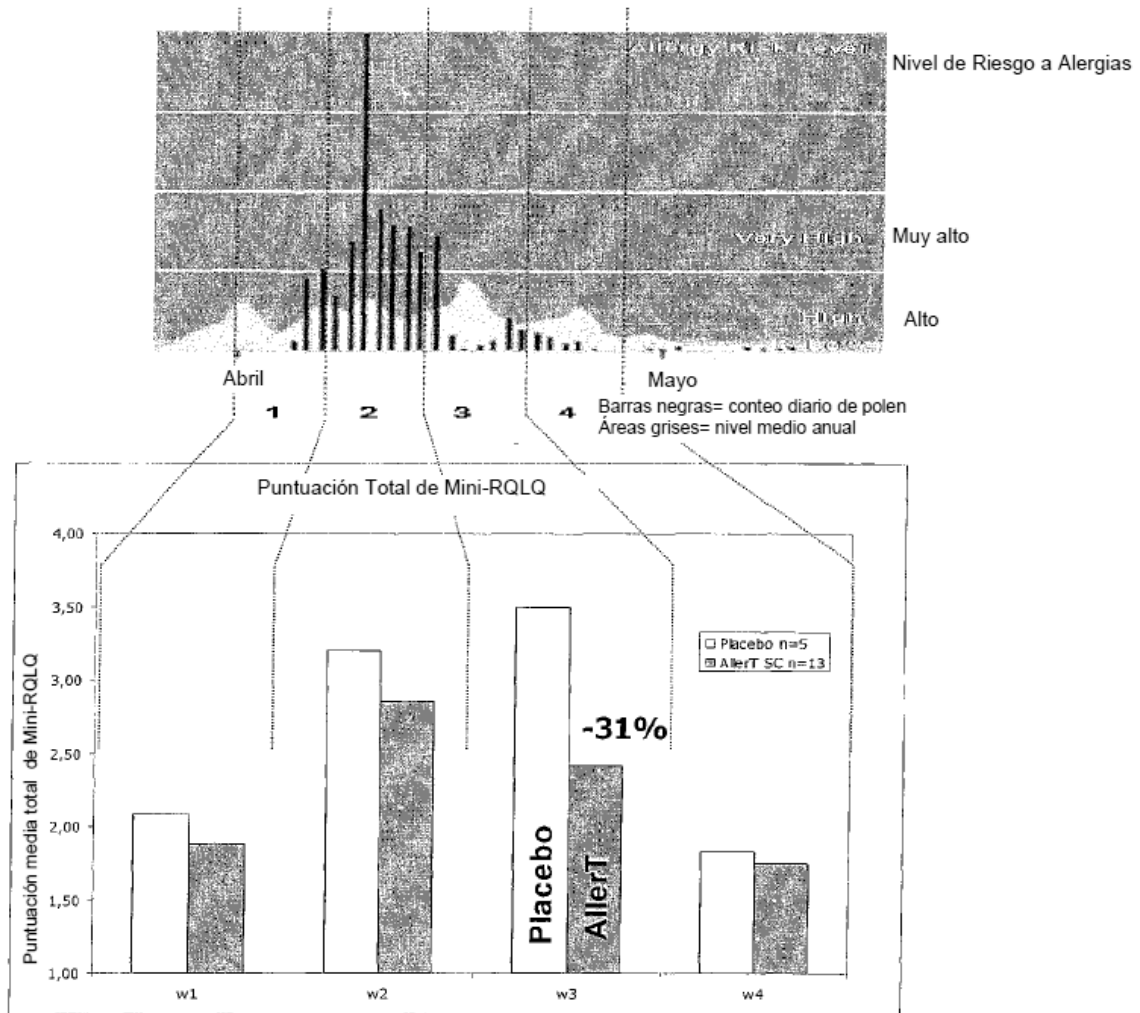


Figura 7: Calidad de vida durante la temporada de polen después del tratamiento con AllerT