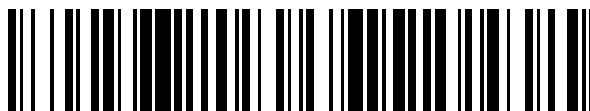


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 700**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 11182398 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2428222**

54 Título: **Combinaciones de péptidos para vacunas contra la alergia a los gatos**

30 Prioridad:

01.06.2007 GB 0710529

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

09.06.2016

73 Titular/es:

**CIRCASSIA LIMITED (100.0%)
Magdalen Centre Robert Robinson Avenue
Oxford Science Park
Oxford, Oxfordshire OX4 4GA, GB**

72 Inventor/es:

**HAFNER, RODERICK PETER;
LARCHE, MARK y
KAY, ANTHONY BARRINGTON**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 573 700 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

Combinaciones de péptidos para vacunas contra la alergia a los gatos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden péptidos para prevenir o tratar la alergia a los gatos y en particular a combinaciones óptimas de péptidos.

10 Antecedentes de la invención

El reconocimiento de antígenos por linfocitos T requiere células presentadoras de antígenos (APC) para presentar fragmentos de antígenos (péptidos) sobre su superficie celular en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos T usan sus receptores de linfocitos T (TCR) específicos de antígeno para reconocer los fragmentos de antígenos presentados por las APC. Tal reconocimiento actúa como un activador del sistema inmunitario para generar un intervalo de respuestas para erradicar el antígeno que se ha reconocido.

El reconocimiento de antígenos externos por el sistema inmunitario de un organismo, tal como el del ser humano, puede producir en algunos casos enfermedades que se conocen como afecciones atópicas. Ejemplos de las últimas son las enfermedades alérgicas que incluyen asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica. En este grupo de enfermedades, los linfocitos B generan anticuerpos de la clase IgE (en seres humanos) que se unen a antígenos derivados externamente, a los que se hace referencia en este contexto como alérgenos ya que estas moléculas provocan una respuesta alérgica. La producción de IgE específica de alérgeno es dependiente de linfocitos T que también se activan por (son específicos para) el alérgeno. Los anticuerpos IgE específica de alérgeno se unen a la superficie de células tales como basófilos y mastocitos en virtud de la expresión de receptores de superficie para IgE por esas células.

El entrecruzamiento de moléculas de IgE unidas a la superficie por alérgeno produce la desgranulación de estas células efectoras provocando la liberación de mediadores inflamatorios tales como histamina 5-hidroxitriptamina y mediadores lipídicos tales como los sulfidoleucotrienos. Además de los eventos dependientes de IgE, determinadas enfermedades alérgicas tales como el asma se caracterizan por eventos independientes de IgE.

Las enfermedades alérgicas mediadas por IgE se tratan actualmente con agentes que proporcionan alivio sintomático o prevención. Ejemplos de tales agentes son antihistamínicos, agonistas β_2 y glucocorticosteroides. Además, algunas enfermedades mediadas por IgE se tratan por procedimientos de desensibilización que implican la inyección periódica de componentes de alérgenos o extractos. Los tratamientos de desensibilización pueden inducir una respuesta de IgG que compite con IgE por el alérgeno o pueden inducir linfocitos T supresores específicos que bloquean la síntesis de IgE dirigida contra el alérgeno. Esta forma de tratamiento no es siempre eficaz y presenta el riesgo de provocar efectos secundarios graves, particularmente choque anafiláctico general. Esto puede ser letal a no ser que se reconozca inmediatamente y se trate con adrenalina. Un tratamiento terapéutico que disminuiría o eliminaría la respuesta inmunitaria alérgica no deseada a un alérgeno particular, sin alterar la reactividad inmunitaria frente a otros antígenos extraños o activar una respuesta alérgica por sí mismo, sería de gran beneficio para individuos alérgicos.

Aproximadamente el 10 % de la población humana mundial son alérgicos a los gatos (*Felis domesticus*) y hasta el 67 % de los pacientes asmáticos son sensibles a alérgenos del gato. El principal alérgeno producido por los gatos es la glucoproteína Fel d1, que provoca una respuesta en el 90-95 % de los pacientes que padecen alergia a los gatos. Un tratamiento terapéutico o preventivo sería, por lo tanto, de gran beneficio para los seres humanos que padecen o están en riesgo de padecer alergia a los gatos.

Los métodos terapéuticos que implican la administración de composiciones que comprenden 13 péptidos derivados de Fel d1 se desvelan en el documento WO 99/34826.

55 Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que ciertas combinaciones de fragmentos de péptidos de la proteína Fel d1 son particularmente útiles en la desensibilización de individuos frente al alérgeno de Fel d1. Las combinaciones de polipéptidos de la invención se han seleccionado por su capacidad de unirse a muchas moléculas de la clase II del MHC y provocar la proliferación de linfocitos T con una liberación de histamina mínima. Las composiciones, productos, vectores y formulaciones de la invención pueden, por lo tanto, proporcionarse a individuos para prevenir o tratar alergia a los gatos por tolerización.

Los polipéptidos de la invención se seleccionaron inicialmente como posibles epítopes de linfocitos T mediante el uso de ensayos de unión péptido-MHC. Véase, por ejemplo, la Figura 1 que demuestra la capacidad de una serie de péptidos derivados de las cadenas 1 y 2 de Fel d1 para unirse a múltiples tipos de DR en ensayos de unión de la clase II del MHC. Estos polipéptidos candidatos se exploraron adicionalmente después para su posible uso en

tolerización.

Una dificultad asociada a los enfoques para la desensibilización basados en la inmunización por péptidos se encuentra en cómo seleccionar un tamaño y región apropiados del alérgeno como base para el péptido que va a usarse para inmunización. El tamaño de péptido de elección es crucial. Si el péptido es demasiado pequeño, la vacuna no sería eficaz en la inducción de una respuesta inmunológica. Si los péptidos son demasiado grandes, o si el antígeno completo se introduce en un individuo, hay riesgo de inducir reacciones adversas, tales como anafilaxia, que puede ser letal.

Los polipéptidos de la invención se han seleccionado para retener la especificidad de linfocitos T mientras que tienen un tamaño lo suficientemente pequeño para no poseer estructura terciaria significativa que les permita retener la conformación de un epítope de unión de IgE de la molécula completa. Los polipéptidos de la invención, por lo tanto, no inducen entrecruzamiento significativo de moléculas de IgE específicas adyacentes en células tales como mastocitos y basófilos y, consecuentemente, no provocan liberación de histamina significativa.

Los péptidos de la invención son ventajosos porque tras la administración a una muestra de linfocitos T producen la proliferación de linfocitos T mientras que provocan una liberación de histamina mínima. Esto se demuestra en el Ejemplo 2. Los polipéptidos de las invenciones son capaces de inducir una respuesta de fase tardía en un individuo alérgico a los gatos. La composición, productos y formulaciones de la invención que comprenden estos polipéptidos o polinucleótidos que son capaces de expresar estos polipéptidos son, por lo tanto, útiles y eficaces en la reducción de la hipersensibilidad frente al alérgeno de Fel d1 en individuos que están sensibilizados a este alérgeno.

Una ventaja adicional de la invención es la capacidad de las combinaciones de péptidos de dirigirse de manera general a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los receptores de linfocitos T (TCR) son altamente variables en su especificidad. La variabilidad se genera, como con moléculas de anticuerpo, a través de eventos de recombinación de genes dentro de la célula. Los TCR reconocen antígenos en forma de péptidos cortos unidos a moléculas codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Estos productos génicos son las mismas moléculas que dan lugar a "tipos tisulares" usados en el trasplante y también se denominan moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA), cuyos términos pueden usarse indistintamente. Las moléculas individuales de MHC poseen ranuras de unión a péptido, debido a su forma y carga, solo son capaces de unir un grupo limitado de péptidos. Los péptidos unidos por una molécula de MHC puede que no estén unidos necesariamente por otras moléculas de MHC.

Cuando una molécula de proteína tal como un antígeno o alérgeno es captada por células presentadoras de antígenos tales como linfocitos B, células dendríticas, monocitos y macrófagos, la molécula se degrada enzimáticamente dentro de la célula. El proceso de degradación da lugar a fragmentos de péptidos de la molécula que, si son del tamaño, carga y forma apropiados, pueden unirse dentro de la ranura de unión a péptido de ciertas moléculas de MHC y presentarse posteriormente en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Si los complejos de péptido/MHC están presentes en la superficie de la célula presentadora de antígeno en números suficientes, entonces pueden activar linfocitos T que portan los receptores de linfocitos T específicos de péptido/MHC apropiados.

Debido a la naturaleza polimorfa del MHC, los individuos en una población exogámica tal como el hombre expresarán diferentes combinaciones de moléculas de MHC en sus superficies celulares. Como diferentes moléculas de MHC pueden unirse a péptidos diferentes de la misma molécula basándose en el tamaño, carga y forma del péptido, diferentes individuos presentarán un repertorio diferente de péptidos unidos a sus moléculas de MHC. La identificación de epítopes de péptidos que se unen a MHC universales en una población exogámica tal como el hombre es más difícil que en animales endogámicos (tales como ciertas cepas de ratones de laboratorio). Basándose en la expresión diferencial de MHC entre individuos y las diferencias inherentes en la unión a péptido y la presentación que esto conlleva, es poco probable que pueda identificarse un único péptido que sea de uso para la terapia de desensibilización en el hombre.

La combinación de péptidos de la invención, sin embargo, proporciona una amplia cobertura de eficacia sobre la población humana, dirigiéndose a la mayoría de los MHC de la población. No será necesario, por ejemplo, tipificar al paciente o individuo para determinar qué moléculas de MHC case II posee para determinar qué péptido o combinación de péptidos sería eficaz. Una vacuna formulada con los péptidos de la invención tendría, por lo tanto, amplia utilidad.

La invención proporciona:

- Una composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir o tratar alergia a los gatos en un individuo, composición que comprende:

(a) como únicos componentes terapéuticos:

- el polipéptido que consiste en la secuencia APCVKRDVDLFLT (SEQ ID NO: 1);

- el polipéptido que consiste en la secuencia EQVAQYKALPVLLENA (SEQ ID NO: 2);
- el polipéptido que consiste en la secuencia KALPVLLENARILKNCV (SEQ ID NO: 3);
- el polipéptido que consiste en la secuencia RILKNCVDAKMTEEDKE (SEQ ID NO: 4);
- el polipéptido que consiste en la secuencia KENALSLLDKIYTSPL (SEQ ID NO: 5);
- el polipéptido que consiste en la secuencia TAMKKIQDCYVENGLI (SEQ ID NO: 6); y
- el polipéptido que consiste en la secuencia SRVLDGLVMTTISSSK (SEQ ID NO: 7);

y

(b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- Una composición farmacéutica que comprende como únicos componentes terapéuticos los polipéptidos como se definen en (a) anteriormente y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- Un método de preparación de una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente, que comprende combinar dichos polipéptidos con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Descripción de los dibujos

Figura 1 - Se probaron péptidos derivados de las cadenas 1 y 2 de Fel d1 para la capacidad de unirse a múltiples tipos de DR en ensayos de unión de la clase II del MHC. Los péptidos que mostraron características de unión promiscuas se seleccionaron y combinaron para generar mezclas de péptidos que se unieran a una amplia población de tipos de la clase II del MHC.

Figura 2 - Representación gráfica de mezclas de péptidos que muestran aquellas que se unen a una amplia población de tipos de la clase II del MHC.

Figura 3 - Proliferación: porcentaje de respondedores y calidad de respuesta. La Figura 3 resume respuestas proliferativas a péptidos y antígenos. El porcentaje de individuos que generan una respuesta proliferativa detectable se muestra en las barras negras. Las barras grises (débil), blancas (moderada) y reticuladas (fuerte) proporcionan un análisis de la calidad de estas respuestas. La calidad se define arbitrariamente por el índice de estimulación (IS: relación de recuentos en presencia de antígeno/péptido divididos por recuentos en medio solo). Por tanto, para el péptido 1 (MLA01), el 12 % de los sujetos generaron una respuesta proliferativa y de estos el 92 % fueron débiles, ninguna fue moderada y el 8 % fueron altas. Las respuestas proliferativas a antígenos/péptidos individuales fueron variables (barra negra). El 92 % de los sujetos tuvieron respuestas proliferativas positivas al antígeno de control positivo PPD. La mayoría de éstas fueron respuestas fuertes (barra reticulada). El 75 % de los sujetos respondieron al extracto de caspa de gato, siendo el 59 % de las respuestas (es decir, el 59 % del 75 %) débiles. La respuesta a la mezcla de los 7 péptidos preferidos (SEQ ID NO: 1 a 7) fue casi idéntica al extracto de caspa de gato (CAT).

Figura 4 - Porcentaje de respondedores por citocina. La Figura 4 resume el porcentaje de individuos que generaron una respuesta detectable a cada uno de los péptidos/antígenos por producción de las tres citocinas medidas. El antígeno de control positivo PPD provocó una producción de citocinas en casi todos los individuos (IFN- γ : 91 %, IL-13: 97 % e IL-10: 96 %). El alérgeno de gato completo y la mezcla de los 7 péptidos provocaron una respuesta de citocinas en aproximadamente el 80 % o más de los sujetos. Los péptidos individuales provocaron respuestas de frecuencia distinta. En general, pareció que la producción de citocinas era un método más sensible de detección de respuestas, dando porcentajes más grandes de individuos respuestas de citocinas positivas que respuestas proliferativas. En la mayoría de los casos se detectó secreción de IL-10 en el mayor número de sujeto e IFN- γ se detectó menos frecuentemente.

Figura 5 - Porcentaje de individuos que producen IFN- γ e intensidad de respuesta tras el cultivo celular con péptido/antígeno. Las respuestas de IFN- γ se detectaron en el 26-44 % de los sujetos en respuesta a péptidos individuales. Estas respuestas fueron predominantemente de muy bajas a bajas a moderadas. Los antígenos complejos indujeron respuestas más frecuentes (mezcla de péptido 80 %, caspa de gato 79 %, PPD 91 %). Estas respuestas fueron de bajas a moderadas a altas. Las respuestas de PPD fueron particularmente altas (89 de las respuestas de PPD fueron por encima de 100 pg/ml).

Figura 6 - Porcentaje de individuos que producen IL-13 e intensidad de respuesta tras el cultivo celular con péptido/antígeno. Las respuestas de IL-13 se detectaron entre el 33-68 % de los sujetos en respuesta a péptidos individuales. Estas respuestas fueron predominantemente de muy bajas a bajas, aunque se detectó un número significativo de respuestas moderadas. Esto puede reflejar la naturaleza de Th2 de sensibilización alérgica en estos sujetos. Los antígenos complejos indujeron respuestas más frecuentes (mezcla de péptidos 85 %, caspa de gato 93 %, PPD 97 %). Estas respuestas fueron de bajas a moderadas a altas.

Figura 7 - Porcentaje de individuos que producen IL-10 e intensidad de respuesta tras el cultivo celular con péptido/antígeno. Las respuestas de IL-10 se detectaron entre el 46-75 % de los sujetos en respuesta a péptidos individuales. Estas respuestas fueron predominantemente de muy bajas abajas. Los complejos de antígeno indujeron respuestas más frecuentes (mezcla de péptidos 93 %, caspa de gato 96 %, PPD 96 %). Estas respuestas fueron de bajas a moderadas. Se observaron muy pocas respuestas "altas" de IL-10.

Figura 8 - Un gráfico representativo que muestra el área de LPSR promedio antes y después del tratamiento para los ocho pacientes en la cohorte de 12,0 nmoles del ensayo clínico de una mezcla preferida de péptidos de la invención.

Descripción de las secuencias mencionadas en el presente documento

SEQ ID NO: 1 a 16 proporcionan las secuencias de polipéptidos de la invención. SEQ ID NO: 1 a 16 se corresponden con los péptidos MLA01, MLA03, MLA04, MLA05, MLA07, MLA12, MLA14, MLA02, MLA06, MLA11, MLA15, MLA16, MLA08, MLA09, MLA10 y MLA13 respectivamente como se muestra en los ejemplos y la Figura 1.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una composición para su uso en prevenir o tratar alergia a los gatos en un individuo, composición que comprende:

(a) como únicos componentes terapéuticos:

- el polipéptido que consiste en la secuencia APCVKRDVDLFLT (SEQ ID NO: 1);
- el polipéptido que consiste en la secuencia EQVAQYKALPVVLENA (SEQ ID NO: 2);
- el polipéptido que consiste en la secuencia KALPVVLENARILKNCV (SEQ ID NO: 3);
- el polipéptido que consiste en la secuencia RILKNCVDAKMTEEDKE (SEQ ID NO: 4);
- el polipéptido que consiste en la secuencia KENALSLLDKIYTSPL (SEQ ID NO: 5);
- el polipéptido que consiste en la secuencia TAMKKIQDCYVENGLI (SEQ ID NO: 6); y
- el polipéptido que consiste en la secuencia SRVLDGLVMTTISSSK (SEQ ID NO: 7); y

(b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona:

- Una composición farmacéutica que comprende como únicos componentes terapéuticos los polipéptidos como se definen en (a) anteriormente y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- Un método de preparación de una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente, que comprende combinar dichos polipéptidos con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Fragmentsos de péptidos de la proteína Fel d1

El alérgeno principal producido por el gato doméstico *Felis catus* (*Felis domesticus*) es la glucoproteína Fel d1. Esta proteína de 39 kDa está formada de dos subunidades de 17 kDa, consistiendo cada una en dos péptidos unidos por disulfuro (cadena 1 y cadena 2 de Fel d1). La secuencia de aminoácidos de Fel d1 se desvela en el documento WO 91/06571. La principal fuente de la proteína Fel d1 son las glándulas sebáceas, aunque la expresión también se detecta en glándulas salivales y las glándulas anales. La función de la proteína Fel d1 es actualmente desconocida, aunque es posiblemente una proteína de unión a feromonas.

Los péptidos de la composición de la invención derivan de Fel d1. Los términos "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento. Fel d1 también se denomina en el presente documento "el alérgeno".

Los péptidos pueden derivar químicamente del alérgeno de polipéptido, por ejemplo, por escisión proteolítica o pueden derivarse en un sentido intelectual del alérgeno de polipéptido, por ejemplo, haciendo uso de la secuencia de aminoácidos del alérgeno de polipéptido y sintetizando péptidos basados en la secuencia. Los péptidos pueden sintetizarse usando métodos bien conocidos en la técnica.

El término "péptido" incluye no solo moléculas en las que los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino también moléculas en las que el enlace peptídico está invertido. Tales peptidomiméticos retroinversos pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como aquellos descritos en Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Este enfoque implica generar pseudopéptidos que contienen cambios que implican el esqueleto y no la orientación de las cadenas laterales. Meziere et al. (1997) muestran que, al menos para las respuestas de la clase II del MHC y linfocitos T cooperadores, estos pseudopéptidos son útiles. Los péptidos retroinversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Similarmente, puede prescindirse completamente del enlace peptídico a condición de que se use un resto conector apropiado que retenga la separación entre los átomos de carbono de los residuos de aminoácidos; se prefiere particularmente si el resto conector tiene sustancialmente la misma distribución de carga y sustancialmente la misma planaridad que un enlace peptídico. También se apreciará que el péptido pueda bloquearse convenientemente en su extremo N o C para ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exoproteolítica. Por ejemplo, el grupo amino del extremo N de los péptidos puede protegerse reaccionando con un ácido carboxílico y el grupo carboxilo del extremo C del péptido puede protegerse reaccionando con una amina. Otros ejemplos de modificaciones incluyen glucosilación y fosforilación. Otra posible modificación es que los hidrógenos de las aminas de cadena lateral de R o K puedan sustituirse con grupos metileno (-NH₂ → -NH(Me) o -N(Me)₂).

*Propiedades de combinaciones de péptidos**Unión de MHC*

5 Las combinaciones preferidas de péptidos normalmente se unen a un gran número de moléculas de HLA diferentes. Esto es beneficioso porque una mayor proporción de individuos en una población se tolerizará por la combinación. Por tanto, las combinaciones preferidas comprenden cualquiera de:

10 (i) al menos dos péptidos que presentan unión fuerte y al menos un péptido que presenta unión moderada a cada elemento de un panel de moléculas de HLA; o

(ii) al menos un péptido que presenta unión fuerte y al menos dos péptidos que presentan unión moderada a cada elemento de dicho panel de moléculas de HLA;

15 en las que el panel de moléculas de HLA comprende al menos siete moléculas de HLA diferentes codificadas por alelos diferentes que tienen una frecuencia acumulada en una población humana exogámica de al menos el 80 % o al menos el 85 %, 90 %, 95 % o 99 %.

20 La fuerza de unión de MHC puede evaluarse por cualquier método adecuado. Métodos preferidos incluyen ensayos de inhibición competitiva en los que la unión se mide en relación con un péptido de referencia. El péptido de referencia es normalmente un péptido que se sabe que es un elemento de unión fuerte para una molécula de MHC dada. En un ensayo tal, un péptido es un elemento de unión débil para una molécula de HLA dada si tiene una CI50 de más de 100 veces menor que el péptido de referencia para la molécula de HLA dada. Un péptido es un elemento de unión moderado si tiene una CI50 más de 20 veces menor, pero menos de 100 veces menor, que el péptido de referencia para la molécula de HLA dada. Un péptido es un elemento de unión fuerte si tiene una CI50 menos de 20 veces menor que el péptido de referencia para la molécula de HLA dada.

25 La población exogámica humana puede ser cualquier población, normalmente una población caucásica. El panel de moléculas de HLA normalmente comprende al menos HLA-DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 y DR15; y opcionalmente también comprende HLA-DRB4 y DRB5. Péptidos de referencia adecuados para estas moléculas de HLA son:

35 DR1 (alelo DRB1*0101): HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT);
 DR3 (alelo DRB1*0301): MT216 (AKTIAYDEEARRGLE);
 DR4 (alelo DRB1*0401): HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT);
 DR7 (alelo DRB1*0701): YKL(AAYAAKAAALAA);
 DR11 (alelo DRB1*1101): HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT);
 DR13 (alelo DRB1*1301): B1 21-36 (TERVRLVTRHIYNREE);
 DR15 (alelo DRB1*1501): A3 152-166 (EAEQLRRAYLDGTGVE);
 40 DRB4 (alelo DRB4*0101): E2/E7 (AGDLLAIETDKATI); y
 DRB5 (alelo DRB5*0101): HA 306-3118 (PKYVKQNTLKLAT).

Liberación de histamina

45 Las combinaciones preferidas de péptidos normalmente inducen la liberación de histamina en una muestra de un individuo alérgico a los gatos que contiene basófilos o mastocitos, que no es mayor del 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % mayor que la liberación de histamina inducida en una muestra del mismo individuo o población de individuos por el alérgeno Fel d1 completo.

50 Una muestra de un individuo alérgico a los gatos es normalmente una muestra de células monoclonales de sangre periférica (CMSP) que puede prepararse como es convencional en la técnica. Un ejemplo de un método adecuado implica el aislamiento de CMSP de una muestra de sangre heparinizada obtenida de un sujeto. Las CMSP se aíslan normalmente a partir de una muestra tal por separación en gradiente de densidad.

55 La liberación de histamina puede evaluarse por cualquier método adecuado, por ejemplo por ELISA. Están comercialmente disponibles varios kits de ensayo adecuados para probar los niveles de liberación de histamina de células en respuesta a cualquier agente de liberación de histamina dado. Normalmente, una muestra de aproximadamente de 5×10^5 a 5×10^6 CMSP se incubará con un agente de liberación de histamina dado a una concentración dada. La concentración de histamina en el medio de incubación o una muestra del medio de incubación se medirá al final de la incubación. La incubación es normalmente durante 30 minutos a 37 °C.

60 Cuando el agente de liberación de histamina es un péptido o combinación de péptidos, normalmente se administrará a varias diluciones diferentes dentro de un intervalo de concentración comparable a aquél que cabría esperar que estuviera presente *in vivo*. Por ejemplo, una dosis de 10 mg de un único péptido que entra en un volumen de sangre de 5 litros produciría una concentración de sangre de 2 ng/ml (2×10^{-6} mg/ml). Por tanto, un intervalo de concentración adecuado para un péptido o combinación de péptidos es normalmente de 10 mg/ml a 1 ng/ml. Puede

hacerse medición única, por duplicado o por triplicado en cada dilución probada dentro de dicho intervalo. Normalmente se requieren aproximadamente 5×10^5 CMSP para cada medición. También se probarán controles positivos adecuados a concentraciones apropiadas que pueden ser fácilmente determinados por el experto. Controles positivos adecuados incluyen el alérgeno completo de Fel d1 o una alternativa adecuada tal como extracto de caspa de gato completa comercialmente disponible. La liberación de histamina espontánea por una muestra de células que no está tratada con un agente de liberación de histamina también puede medirse como un control negativo/indicador de liberación de histamina de fondo. Cuando dos o más diluciones de una preparación de péptido/alérgeno provocan el 10 % o más de liberación de histamina por encima del fondo, o cuando se consigue un único valor del 10 % o más por encima del fondo a la mayor concentración probada, esto se considerará normalmente una "liberación de histamina positiva".

La concentración de histamina en el medio de incubación de cualquier muestra se medirá normalmente por ELISA. Ensayos de ELISA adecuados normalmente implican añadir un agente de acilación de histamina a una muestra del medio de incubación junto con un tampón adecuado. La histamina acilada es más estable que la histamina y las muestras tratadas de este modo pueden almacenarse durante más tiempo antes del análisis. El análisis normalmente implica la adición de reactivos anti-acil-histamina conjugados con fosfatasa alcalina, seguido de la adición de un sustrato de fosfatasa alcalina cromogénico adecuado. La concentración de histamina se determina por medición de la absorbancia y comparación con una curva patrón calibrada frente a concentraciones de histamina conocidas.

Liberación de citocinas

Las combinaciones preferidas de péptidos normalmente inducen un perfil de liberación de citocinas en una muestra de un individuo alérgico a los gatos que contiene linfocitos T, que es equivalente al perfil de liberación de citocinas inducido en una muestra del mismo individuo o población de individuos por el alérgeno de Fel d1 completo.

Una muestra de un individuo alérgico a los gatos o población es normalmente una muestra de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) que puede prepararse como es habitual en la técnica. El perfil de liberación de citocinas puede evaluarse por cualquier método adecuado. Métodos adecuados incluyen medir el nivel de una, dos, tres o más citocinas diferentes liberadas en una muestra en ensayos independientes. Ensayos adecuados incluyen ELISA y ensayos Luminex.

Se considera que un perfil de liberación de citocinas inducido en una muestra es equivalente al perfil de liberación de citocinas de una muestra diferente cuando el nivel de ciertas citocinas específicas producidas es similar en ambas muestras. Más específicamente, se considera que los perfiles de liberación de citocinas de dos muestras diferentes son equivalentes cuando los niveles de IL-10 e IL-13 producidos en una muestra difieren en no más del 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % de los niveles de IL-10 e IL-13 producidos en la segunda muestra.

Por tanto, una combinación de péptidos preferida induce la producción de IL-10 e IL-13 a niveles que difieren en no más del 10 % de los niveles de IL-10 e IL-13 inducidos en una muestra del mismo individuo o población de individuos por el alérgeno de Fel d1 completo.

Un ensayo de liberación de citocinas típico es del siguiente modo:

Se distribuyen 250 μ l de una solución de 200 μ g/ml de la concentración de antígeno o péptido adecuado en los pocillos adecuados de, por ejemplo, placas de 48 pocillos. Las placas se incuban después en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO_2 a 37 °C durante un máximo de 4 horas. Después se añaden 250 μ l de una suspensión de CMSP a 5×10^6 células/ml a cada pocillo y las placas se devuelven a la estufa de incubación durante 5 días. Entonces se recogen las muestras de sobrenadante de cultivo como alícuotas múltiples para su uso en ensayos de ELISA. Las muestras pueden congelarse y almacenarse antes del análisis. Se ensaya una alícuota para la presencia de una citocina. Normalmente, la presencia de una citocina se establece usando un ensayo ELISA según las prácticas convencionales en la técnica. Las concentraciones de citocinas en una muestra se determinan normalmente por interpolación de curvas patrón generadas en el mismo ensayo.

Los polipéptidos de composiciones de la invención pueden estar presentes en una forma sustancialmente aislada. Pueden estar mezclados con vehículos o diluyentes que no interferirán con su uso previsto y todavía considerarse como aislados sustancialmente. También pueden estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso generalmente comprenderán al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 %, el 98 % o el 99 % de las proteínas de la preparación.

Formulaciones y composiciones

La presente invención proporciona una formulación farmacéutica para su uso en prevenir o tratar la alergia a los gatos por tolerización que comprende polipéptidos como se ha descrito anteriormente junto con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente uno o más de otros componentes terapéuticos. El (Los) vehículo(s) debe(n) ser 'aceptable(s)' en el sentido de ser compatibles con los otros

componentes de la formulación y no deben ser nocivos para el receptor de la misma. Normalmente, los vehículos para inyección, y la formulación final, son estériles y están libres de pirógenos. La formulación de una composición de la invención puede llevarse a cabo usando químicas y metodologías de formulación farmacéutica convencionales, todas las cuales están fácilmente disponibles de manera razonable para el experto.

5 Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden comprender uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH y similares, pueden estar presentes en el excipiente o vehículo. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares son generalmente agentes farmacéuticos que no inducen una respuesta inmunitaria en el individuo que recibe la composición y que pueden administrarse sin excesiva toxicidad. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. También pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables en las mismas, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Una discusión exhaustiva de excipientes, vehículos y sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991).

Tales composiciones pueden prepararse, envasarse o comercializarse en una forma adecuada para administración en bolo o para administración continua. Las composiciones inyectables pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o recipientes multidosis que contienen un conservante. Las composiciones incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones de liberación sostenida implantables o biodegradables. Tales composiciones pueden comprender adicionalmente uno o más componentes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una realización de una composición para administración parenteral, el principio activo se proporciona en forma deshidratada (por ejemplo, un polvo o gránulos) para su reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma de una suspensión o solución acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión o solución puede formularse según la técnica conocida y puede comprender, además del principio activo, componentes adicionales tales como los agentes de dispersión, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Tales formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un disolvente o diluyente no tóxico parenteralmente aceptable tal como, por ejemplo, agua o 1,3-butanodiol. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer, solución de cloruro sódico isotónico y aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos. Otras composiciones parenteralmente administrables que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposómica, o como un componente de sistemas de polímeros biodegradables. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble o una sal poco soluble.

Alternativamente, los péptidos en la composición de la presente invención pueden estar encapsulados, adsorbidos a o asociados con vehículos en partículas. Vehículos en partículas adecuados incluyen aquellos derivados de polímeros de poli(metacrilato de metilo), así como micropartículas de PLG derivadas de poli(lactidas) y poli(lactidas-co-glicolidas). Véase, por ejemplo, Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10:362-368. También pueden usarse otros sistemas en partículas y polímeros, por ejemplo, polímeros tales como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, así como conjugados de estas moléculas.

La formulación de cualquiera de los péptidos mencionados en el presente documento dependerá de factores tales como la naturaleza de la sustancia y el método de administración. Cualquiera de tales sustancias puede administrarse en una variedad de formas de dosificación. Puede administrarse por vía oral (por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables), por vía parenteral, por vía subcutánea, por inhalación, por vía intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica o por técnicas de infusión. La sustancia también puede administrarse como supositorios. Un médico será capaz de determinar la vía de administración requerida para cada individuo particular.

Las composiciones de la invención comprenderán una concentración adecuada de cada péptido para que sea eficaz sin provocar una reacción adversa. Normalmente, la concentración de cada péptido en la composición estará en el intervalo de 0,03 a 200 nmol/ml. Más preferiblemente en el intervalo de 0,3 a 200 nmol/ml. La composición o formulaciones deben tener una pureza de más del 95 % o 98 % o una pureza de al menos el 99 %.

Métodos terapéuticos e individuos a tratar

La invención proporciona una composición que comprende péptidos, que es útil en la prevención o tratamiento de alergia a los gatos. La invención también proporciona un método de tolerización o desensibilización de un individuo alérgico a los gatos que comprende administrar la composición de la invención como se ha descrito anteriormente.

El individuo a tratar o al que se proporciona la composición o formulación de la invención es preferiblemente un ser humano. Se apreciará que puede saberse que el individuo a tratar está sensibilizado a la alergia a Fel d1, a riesgo de sensibilizarse o de que se sospeche que está sensibilizado. El individuo puede probarse para sensibilización usando métodos bien conocidas en la técnica y como se describe en el presente documento. Alternativamente, el individuo puede tener una historia familiar de alergia a los gatos. Puede que no sea necesario probar un individuo para la sensibilización a Fel d1 porque el individuo puede presentar síntomas de alergia cuando se pone cerca de un gato. Cerca significa 10 metros o menos, 5 metros o menos, 2 metros o menos, 1 metro o menos o a 0 metros del gato. Los síntomas de la alergia pueden incluir picor de ojos, rinorrea, dificultades para respirar, enrojecimiento y picor de la piel o erupción.

El individuo a tratar puede tener cualquier edad. Sin embargo, preferiblemente, el individuo puede estar en el grupo de edad de 1 a 90, 5 a 60, 10 a 40 o más preferiblemente de 18 a 35. Los grupos de individuos que probablemente se beneficien del tratamiento son, por ejemplo, propietarios de gatos, veterinarios y otros adiestradores de gatos.

Preferiblemente, el individuo a tratar es de una población que tiene las frecuencias alélicas de MHC dentro del intervalo de frecuencias que son representativas de la población caucásica. Las frecuencias alélicas de la población de referencia para 11 familias de alelos de DRB1 comunes se muestran en la Tabla 3 del Ejemplo 2 (datos de HLA Facts Book, Parham y Barber). Las frecuencias de referencia se obtuvieron por análisis de estudios múltiples que indicaban las frecuencias y las cifras mostradas son valores medios. Preferiblemente, por lo tanto, el individuo a tratar es de una población que tiene frecuencias alélicas de MHC equivalentes a la población de referencia para los alelos mencionados en la Tabla 3 (tales como para al menos 1, 2, 3, 4, 5 o todos los alelos), por ejemplo, dentro de los intervalos de aquellas cifras más o menos el 1, 2, 3, 5, 10, 15 o 20 %.

Preferiblemente, el individuo es de una población en la que las frecuencias alélicas de los siguientes alelos de DRB1 son:

4 - al menos el 9 %

7 - al menos el 10 %

11 - al menos el 8 %.

El individuo puede haber tenido alergia a los gatos durante al menos 2 semanas, 1 mes, 6 meses, 1 año o 5 años. El individuo puede padecer erupción, congestión nasal, secreción nasal y/o tos causados por la alergia. Puede que se le hayan administrado o no al individuo otras composiciones/compuestos que tratan la alergia a los gatos. El individuo puede vivir en una población que comprende al menos 0,1 gatos por habitante humano.

Métodos de administración

Una vez formuladas las composiciones de la invención, pueden administrarse a un sujeto *in vivo* usando una variedad de vías y técnicas conocidas. Por ejemplo, una composición puede proporcionarse como una solución, suspensión o emulsión inyectable y administrarse por vía parenteral, inyección subcutánea, epidérmica, intradérmica, intramuscular, intrarterial, intraperitoneal, intravenosa usando una aguja y jeringa convencionales, o usando un sistema de inyección de chorro de líquido. Las composiciones también pueden administrarse tópicamente a la piel o tejido mucoso, tal como nasalmente, intratraquealmente, intestinal, rectalmente o vaginalmente, o proporcionarse como un espray finamente dividido adecuado para administración respiratoria o pulmonar. Otros modos de administración incluyen administración por vía oral, supositorios, administración sublingual y técnicas de administración transdérmica activas o pasivas.

Cuando una composición de la invención va a administrarse, se prefiere administrar la composición a un sitio en el cuerpo en el que los péptidos tendrán la capacidad de ponerse en contacto con células presentadoras de antígenos adecuadas, y en el que tendrán la oportunidad de ponerse en contacto con linfocitos T del individuo.

Pautas de administración

La administración de la composición puede ser por cualquier método adecuado como se describe anteriormente. Cantidades adecuadas del péptido pueden determinarse empíricamente, pero normalmente están en el intervalo dado más adelante. Una administración única de cada péptido puede ser suficiente para tener un efecto beneficioso para el paciente, pero se apreciará que puede ser beneficioso si el péptido se administra más de una vez, en cuyo caso las pautas de administración típicas pueden ser, por ejemplo, una o dos veces por semana durante 2-4 semanas cada 6 meses, o una vez al día durante una semana cada de cuatro a seis meses. Como se apreciará, cada péptido o polinucleótido, o combinación de péptidos y/o polinucleótidos, puede administrarse a un paciente individualmente o en combinación.

Las dosificaciones para la administración dependerán de varios factores que incluyen la naturaleza de la composición, la vía de administración y el programa y momento exacto de la pauta de administración. Dosis

5 adecuadas de una molécula o una combinación de moléculas en una composición de la invención pueden estar en el orden de hasta 10 µg, hasta 15 µg, hasta 20 µg, hasta 25 µg, hasta 30 µg, hasta 35 µg, hasta 50 µg, hasta 100 µg, hasta 500 µg o más por administración. Dosis adecuadas pueden ser inferiores a 15 µg, pero al menos 1 ng, o al menos 2 ng, o al menos 5 ng, o al menos 50 ng, o al menos 100 ng, o al menos 500 ng, o al menos 1 µg, o al menos 10 µg. Para algunas moléculas o combinaciones de la invención, la dosis usada puede ser más alta, por ejemplo, hasta 1 mg, hasta 2 mg, hasta 3 mg, hasta 4 mg, hasta 5 mg o más altas. Tales dosis pueden proporcionarse en una formulación líquida, a una concentración adecuada para permitir un volumen apropiado para administración por la vía seleccionada. Se entenderá que las dosis anteriores se refieren a la dosis total en el caso de una combinación de moléculas. Por ejemplo, "hasta 35 µg" se refiere a una concentración de péptido total de hasta 35 µg en una composición que comprende una combinación de más de un péptido.

10 La invención se ilustra por los siguientes ejemplos.

15 **Ejemplo 1: Cribado de mezclas de péptidos para características de unión de MHC**

Ensayos de Unión

Péptidos

20 Se investigaron los siguientes péptidos que engloban las secuencias de Fel d1 para su capacidad para unirse a las nueve moléculas de HLA-DR: DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, B4 y B5.

					SEQ ID NO:
MLA1	H ₂ N	EICPAVKRDVDFLTGT	COOH	Derivado de la cadena 1 de Fel d1	Relacionado con 1
MLA2	H ₂ N	LFLTGTPDEYVEQVAQY	COOH	Derivado de la cadena 1 de Fel d1	8
MLA3	H ₂ N	EQVAQYKALPVVLENA	COH	Derivado de la cadena 1 de Fel d1	2
MLA4	H ₂ N	KALPVVLENARILKNCV	COOH	Derivado de la cadena 1 de Fel d1	3
MLA5	H ₂ N	RILKNCVDAKMTEEDKE	COOH	Derivado de la cadena 1 de Fel d1	4
MLA6	H ₂ N	KMTEEDKENALLDK	COOH	Derivado de la cadena 1 de Fel d1	9
MLA7	H ₂ N	KENALSVLDKIYTSPL	COOH	Derivado de la cadena 1 de Fel d1	5
MLA8*	<i>H₂N</i>	<i>VKMAETCPIFYDVFFA</i>	<i>COOH</i>	<i>Derivado de la cadena 2 de Fel d1</i>	13
MLA9*	<i>H₂N</i>	<i>CPIFYDVFFAVANGNEL</i>	<i>COOH</i>	<i>Derivado de la cadena 2 de Fel d1</i>	14
MLA10*	<i>H₂N</i>	<i>GNELLLKLSLTKVNAT</i>	<i>COOH</i>	<i>Derivado de la cadena 2 de Fel d1</i>	15
MLA11	H ₂ N	LTKVNATEPERTAMKK	COOH	Derivado de la cadena 2 de Fel d1	10
MLA12	H ₂ N	TAMKKIQDCYVENGLI	COOH	Derivado de la cadena 2 de Fel d1	6
MLA13*	<i>H₂N</i>	<i>CYVENGLISRVL DGLV</i>	<i>COOH</i>	<i>Derivado de la cadena 2 de Fel d1</i>	16
MLA14	H ₂ N	SRVLDGLVMTTISSSK	COOH	Derivado de la cadena 2 de Fel d1	7
MLA15	H ₂ N	ISSSKDCMGEAVQNTV	COOH	Derivado de la cadena 2 de Fel d1	11
MLA16	H ₂ N	AVQNTVEDLKLNTLGR	COOH	Derivado de la cadena 2 de Fel d1	12
*Los péptidos mostrados en cursiva se evaluaron para la unión, pero no se consideraron adicionalmente en estos experimentos debido a solubilidad relativamente escasa.					

25 *Condiciones de unión para ensayos de unión de MHC*

Se usaron líneas celulares homocigóticas de VEB como fuentes de moléculas humanas de la clase II de HLA (Tab. 4). Se purificaron moléculas de HLA-DR por cromatografía de afinidad usando el mAb monoclónico L234 (ATTC, Rockville, EE.UU.) acoplado a proteína A-gel Sepharose CL 4B (Pharmacia, Francia). Brevemente, se lisaron las células en hielo a 5x10⁶ células/ml en NaCl 150 mM, tampón Tris-HCl 10 mM a pH=8,3 que contenía Nonidet P40 al 1 % (NP40), 10 mg/l de aprotinina, EDTA 5 mM y PMSF 10 mM. Después de la centrifugación a 100.000 g durante 1 h, el sobrenadante se aplicó a columnas de Sepharose 4B y de proteína A-Sepharose 4B y después a la columna de afinidad específica. Las moléculas de HLA-DR se eluyeron con n-dodecil b-D-maltósido (DM) 1,1 mM, NaCl 500 mM y Na₂CO₃ 500 mM a pH=11,5. Las fracciones se neutralizaron inmediatamente a pH=7 con tampón Tris-HCl 2 M a pH=6,8 y se dializaron ampliamente contra DM 1 mM, NaCl 150 mM, tampón fosfato 10 mM a pH=7. Para las moléculas de HLA-DR más allá del número de lote 40, DM 1 mM en tampón de diálisis se substituyó por NOGP 1 mM.

Las moléculas de HLA-DR se diluyeron en fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, DM 1 mM, citrato 10 mM, tampón de timerosal al 0,003 % con un péptido biotinilado apropiado y diluciones en serie de péptidos competidores. Las condiciones de unión de cada molécula se detallan en la Tab 4. Las muestras (100 µl por pocillo) se incubaron en placas de polipropileno de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) a 37 °C durante de 24 h a 72 h. Después de la

neutralización con 50 µl de Tris-HCl 450 mM a pH=7,5, timerosal al 0,003 %, BSA al 0,3 %, tampón DM 1 mM, las muestras se aplicaron a placas de ELISA de 96 pocillos maxisorp (Nunc, Dinamarca) previamente recubiertas con 10 mg/ml del mAb L243 y se saturaron con Tris-HCl 100 mM a pH=7,5, BSA al 0,3 %, tampón timerosal al 0,003 %. Se permitió que se unieran a las placas recubiertas con anticuerpos durante 2 h a temperatura ambiente. El péptido biotinilado unido se detectó por incubación con conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (Amersham, RU) y después de lavados, añadiendo sustrato de fosfato de 4-metilumbeliferilo (Sigma, Francia). La fluorescencia emitida se midió a 450 nm tras la excitación a 365 nm en un fluorímetro contador de marcas múltiples Wallac Victor2 1420 (Perkin Elmer). La unión máxima se determinó por incubación del péptido biotinilado con la molécula de MHC II en ausencia de competidor. Se evaluó la especificidad de unión añadiendo un exceso de péptido no biotinilado. El fondo no fue significativamente diferente del obtenido por la incubación del péptido biotinilado sin moléculas de MHC II. Los datos se expresaron como la concentración de péptido que previno la unión del 50 % del péptido marcado (CI50). A continuación se evaluó la capacidad de unión en relación con péptidos de control de unión fuerte (referencia) conocidos. Péptidos de referencia adecuados para los alelos de HLA probados en estos experimentos son: DR1 (alelo DRB1*0101): HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT); DR3 (alelo DRB1*0301): MT216 (AKTIAYDEEARRGLE); DR4 (alelo DRB1*0401): HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT); DR7 (alelo DRB1*0701): YKL (AAAYAAKAAALAA); DRB1*1101: HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT); DR13 (alelo DRB1*1301): B1 21-36 (TERVRLVTRHIYNREE); DR15 (alelo DRB1*1501): A3 152-166 (EAEQLRRAYLDGTGVE); DRB4 (alelo DRB4*0101): E2/E7 (AGDLLAIETDKATI); y DRB5 (alelo DRB5*0101): HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT).

20 *Resultados*

Se discriminaron primero los péptidos de unión y no de unión basándose en un umbral superior de 1000 nM como generalmente se describe en la bibliografía (Southwood et al. (1998). J Immunol 160:3363; Geluk et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:10797), pero se evalúan adicionalmente por comparación con péptidos de referencia. Los péptidos de referencia se seleccionan de entre los mejores péptidos de unión de cada molécula de HLA dada. En relación con los péptidos de referencia, un péptido presenta una unión débil para una molécula de HLA dada si tiene una CI50 más de 100 veces menor que el péptido de referencia para la molécula HLA dada. Un péptido presenta una unión moderada si tiene una CI50 más de 20 veces menor, pero menos de 100 veces menor, que el péptido de referencia para la molécula de HLA dada. Un péptido presenta una unión fuerte si tiene una CI50 menos de 20 veces menor que el péptido de referencia para la molécula de HLA dada.

Análisis de mezclas de péptidos preferidas

Los nueve alelos de HLA usados para estos experimentos engloban una alta proporción de la población caucásica. (Las frecuencias de referencia de los alelos de HLA en la población se proporcionan en la Tabla 3 del Ejemplo 2). Por consiguiente, se evaluaron las combinaciones de péptidos para determinar cuál daría la cobertura más amplia de diferentes moléculas de HLA. Los criterios objetivo para una mezcla se definieron, por lo tanto, de la siguiente manera: Para una molécula de HLA dada, una mezcla debe comprender o bien 2 péptidos con unión fuerte y 1 péptido con unión moderada, o bien 1 péptido con unión fuerte y 3 péptidos con unión moderada. Las mezclas preferidas logran estos criterios para los nueve tipos de HLA probados. Solo los péptidos con secuencias correspondientes a las SEQ ID NO: 1 a 12 se consideraron en este análisis, ya que se encontró que los péptidos con secuencias correspondientes a las SEQ ID NO: 13 a 16 eran poco solubles. A partir de SEQ ID NO: 1 a 12 hay más de 3000 combinaciones posibles de péptidos que posiblemente podrían cumplir los criterios objetivo expuestos anteriormente.

Para permitir la visualización de estas combinaciones se aplicó un sistema de puntuación binario tal que para cada tipo de HLA, cuando una combinación de péptidos logra uno de los criterios anteriores, se introdujo una puntuación de "1" y cuando los criterios no se cumplieron se introdujo una puntuación de "0". Las puntuaciones a través de todos los tipos de HLA se suman después, de modo que una mezcla que no cumple los criterios para ninguno de los tipos de HLA tendrá una puntuación de 0, mientras que una mezcla que cumple los criterios para los nueve tipos de HLA tendrá una puntuación 9. Las puntuaciones para cada combinación de péptidos se representan en la Figura de 2A a Q. La mayor puntuación de nueve se consiguió por las 10 mezclas mostradas a continuación:

Figura 2A	punto 16	MLA 01, 02, 03, 04, 05, 12, 14
Figura 2B	punto 272	MLA 01, 03, 04, 05, 07, 12, 14
Figura 2C	punto 472	MLA 02, 03, 04, 05, 06, 12, 14
Figura 2C	punto 482	MLA 02, 03, 04, 05, 07, 12, 14
Figura 2C	punto 488	MLA 02, 03, 04, 05, 11, 12, 14
Figura 2C	punto 494	MLA 02, 03, 04, 05, 12, 14, 15
Figura 2C	punto 495	MLA 02, 03, 04, 05, 12, 14, 16
Figura 2D	punto 699	MLA 03, 04, 05, 07, 12, 14, 15
Figura 2D	punto 700	MLA 03, 04, 05, 07, 12, 14, 16
Figura 2G	punto 1271	MLA 02, 03, 04, 05, 12, 14

55 Por tanto, estas mezclas son combinaciones preferidas de péptidos para su uso en vacunación.

Ejemplo 2: Cribado en sección transversal de sujetos alérgicos a los gatos para respuestas de linfocitos T y liberación de histamina por basófilos por epítopes de péptidos de linfocitos T caracterizados por MHC derivados de Fel d1

5 1. Introducción

1.1 Ensayo de liberación de histamina

10 El fin de este ensayo fue identificar péptidos individuales que son capaces de activar basófilos sanguíneos (como un sustituto de los mastocitos tisulares), produciendo la liberación de histamina que puede producir reacciones alérgicas durante la terapia. Los péptidos o combinaciones de péptidos que inducen la liberación de histamina frecuentemente pueden considerarse inadecuados para la inclusión en la vacuna de péptido.

15 La liberación de histamina requiere el entrecruzamiento de moléculas de IgE específicas adyacentes en la superficie del basófilo. Los péptidos que se evaluaron fueron pequeños (13 a 17 aminoácidos de longitud) y, por lo tanto, no deben tener estructura terciaria significativa que les permitiera retener la conformación de un epítipo de unión a IgE de la molécula completa. Adicionalmente, los monómeros de péptidos en solución, incluso si están unidos por IgE, no deben ser capaces de entrecruzarse con moléculas adyacentes de IgE. Debe indicarse, sin embargo, que algunos de los péptidos contienen residuos de cisterna que pueden producir una formación de enlaces disulfuro entre péptidos individuales y también entre diferentes péptidos en una mezcla. Por tanto, pueden generarse dímeros de péptidos que pueden tener potencial de entrecruzamiento de IgE. En el presente análisis no se usaron excipientes en la formulación de péptidos para prevenir o reducir la formación de dímeros mediante enlace disulfuro.

25 Se evaluó la liberación de histamina a partir de sangre completa periférica recientemente extraída de sujetos alérgicos a los gatos. Se usaron basófilos de sangre periférica como sustitutos de mastocitos tisulares que no fueron prácticos para el ensayo. La sangre se incubó *in vitro* con 9 péptidos individuales de la secuencia del alérgeno principal del gato Fel d1 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 y 12). Estos péptidos se seleccionaron como posibles epítipes de linfocitos T tras los ensayos de unión de péptido-MHC como se explica en el Ejemplo 1. Adicionalmente, se analizaron respuestas a mezclas preferidas de una mezcla de 7 péptidos identificada en el Ejemplo 1. La mezcla preferida probada de 7 péptidos consistió en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 7. La liberación de histamina en respuesta a extracto de alérgeno de caspa de gato completo actuó de control positivo.

1.2 Ensayo de proliferación

35 El fin del ensayo de proliferación fue determinar el porcentaje de la población que respondió a cada péptido individual/péptido auxiliar y la mezcla preferida de 7 péptidos.

1.3 Ensayos de citocinas

40 El fin de los ensayos de citocinas fue doble; (1) determinar el porcentaje de la población que respondió a cada péptido individual y la mezcla preferida de 7 péptidos y (2) identificar péptidos individuales que poseen características de inducción de Th2 (IL-13) intrínsecas que no serían deseables en una vacuna de péptido para una enfermedad alérgica y también identificar péptidos individuales que poseen características de inducción de IL-10 intrínsecas que pueden ser beneficiosas para una vacuna de péptido para una enfermedad alérgica.

2. Materiales y métodos

2.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

50 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de la muestra de sangre heparinizada obtenida del sujeto. Las CMSP se aislaron por separación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Una vez aisladas, las células se usaron en el ensayo de proliferación celular, ensayo de liberación de histamina y ELISA y el ensayo de liberación de citocinas.

2.2 Ensayo de liberación de histamina y ELISA de histamina

55 Se realizaron ensayos en CMSP (que contienen basófilos). Cada péptido y combinación de péptidos se comparó con moléculas de alérgeno completo en un ensayo de liberación de histamina. Las concentraciones de histamina se midieron por ELISA.

60 El ensayo requirió 3×10^6 CMSP por sujeto. El ensayo se realizó usando el kit de inmunoensayo de liberación de histamina de Immunotech según las instrucciones del fabricante. Tras el ensayo de liberación de histamina, las muestras aciladas se probaron por ELISA de histamina. El ELISA de histamina usó 50 μ l de la muestra acidada de 100 μ l generada por el ensayo de liberación de histamina. Los 50 μ l restantes de muestra se retuvieron congelando a -20 °C hasta que se completó la sección de análisis de datos del ELISA. Una vez se habían analizado los resultados y realizado el ELISA de un modo satisfactorio, se desecharon las muestras.

Se ensayaron péptidos para su capacidad de inducir la liberación de histamina en un intervalo de $5 \log_{10}$ (10 $\mu\text{g/ml}$ a 1 ng/ml). El intervalo de concentraciones ensayado se seleccionó basándose en las dosis *in vivo* teóricas de péptido que pueden conseguirse durante la terapia. Por ejemplo, una dosis de 10 μg de péptido que entra en un volumen de sangre de 5 litros produciría una concentración de sangre de 2 mg/ml (2×10^6 mg/ml), en el extremo inferior del intervalo de dosis del ensayo de liberación de histamina. Se usó extracto de caspa de gato completo (C. B. F. LETI) como control positivo para la liberación durante un intervalo de concentración ligeramente superior (100 μg a 10 ng/ml). Se realizaron mediciones individuales (es decir, no duplicadas o triplicadas) para cada dilución. Se ensayó una muestra de sangre duplicada para la liberación de histamina espontánea y el valor medio de estas muestras se restó de todos los resultados de péptido/alérgeno.

Después de la finalización del ELISA de histamina, se determinaron los niveles de histamina individuales por interpolación en la curva patrón generada en el ensayo de ELISA. Se ajustaron los resultados de las muestras para permitir cualquier dilución de las muestras. Cuando dos o más diluciones de una preparación de péptido/alérgeno provocaron el 10 % o más de liberación de histamina por encima del fondo, o cuando se consiguió un único valor del 10 % o más por encima el fondo a la mayor concentración probada, esto se consideró una "liberación de histamina positiva".

2.3 Ensayo de proliferación celular

El ensayo de proliferación celular se realizó en CMSP (se requirieron 140×10^6 células para todos los parámetros a probar). La proliferación se midió por la incorporación del compuesto radiomarcado ^3H -timidina.

En más detalle, se distribuyeron 100 μl de la concentración de péptido o antígeno apropiada en los pocillos apropiados de placas de 96 pocillos. Las placas se colocaron entonces en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO_2 establecida a 37 °C durante un máximo de 4 horas. Se prepararon CMSP aisladas como se describe anteriormente a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio completo a temperatura ambiente. A continuación se distribuyeron 100 μl de solución celular en cada uno de los pocillos de las placas de 96 pocillos que contenían antígeno/péptido. . A continuación, las placas se incubaron durante 6 a 8 días. Los cultivos se pulsaron con solución de timidina tritiada añadiendo 10 μl de solución madre de timidina tritiada (1,85 MBq/ml en medio RPMI libre de suero) a cada pocillo. A continuación, las placas se devolvieron a la estufa de incubación durante entre 8 y 16 horas. Los cultivos se recogieron después usando un colector de células FilterMate 196 de Canberra Packard. Se contaron tiras de filtro secas usando un contador de centelleo beta apropiado.

Se compararon estadísticamente los recuentos de los pocillos que contenían péptidos con pocillos que contenían medio solo (12 pocillos por grupo). Se usó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Se usó la misma prueba estadística para todos los sujetos. Una diferencia estadísticamente significativa entre los pocillos solo con medio y los pocillos estimulados por péptido se consideró una estimulación positiva de las CMSP por el péptido.

2.4 Ensayo de liberación de citocinas

Se analizaron los perfiles de secreción de citocinas de las CMSP en respuesta a la estimulación de péptidos. Se probaron los sobrenadantes del ensayo de liberación de citocinas para la presencia de 3 citocinas, IFN- γ , IL-10 e IL-13, usando ensayos de ELISA.

El ensayo de liberación de citocinas requirió 40×10^6 CMSP por sujeto. En más detalle, se distribuyeron 250 μl de una solución de 200 $\mu\text{g/ml}$ de la concentración de antígeno o péptido apropiada en los pocillos adecuados de placas de 48 pocillos. Se incubaron las placas en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO_2 a 37 °C durante un máximo de 4 horas. A continuación se añadieron 250 μl de una suspensión de 5×10^6 células/ml de CMSP a cada pocillo y las placas se devolvieron a la estufa de incubación durante 5 días.

Tras la estimulación, las muestras de sobrenadante de cultivo se recogieron en 3 alícuotas y se congelaron hasta que se pudieron realizar los ensayos ELISA. Se probó una alícuota para la presencia de una citocina (por lo tanto, se requirió que las 3 alícuotas se probaran para las 3 citocinas). Los niveles de citocinas de las muestras se determinaron por interpolación de curvas patrón también generadas en el ensayo.

3. Resultados

Visión general de los resultados

3.1 Liberación de Histamina

Tabla 1 – Visión general de la liberación de histamina

Sujeto	Control positivo (liberación 10 % por encima del valor inicial)		Péptido individual (liberación 10 % por encima del valor inicial)		Mezcla de péptidos (liberación 10 % por encima del valor inicial)	
	2 o más diluciones	Solo la concentración más alta	2 o más diluciones	Solo la concentración más alta	2 o más diluciones	Solo la concentración más alta
% de sujetos que muestran liberación	70,4	7,4	17,3	18,5	2,5	2,5
Porcentaje total que muestran liberación de histamina por grupo	77,8		30,9*		5	

*en algunos sujetos, algunos péptidos provocaron la liberación a 2 o más concentraciones y otros solo a la dosis más alta. Por tanto, los dos números no pueden simplemente sumarse ya que son para extracto de caspa de gato y la mezcla de péptidos. Similarmente, los valores para la liberación de péptidos individuales no pueden sumarse a los valores para la mezcla de péptidos ya que 2 de los sujetos con liberación de histamina a la mezcla también habían la liberado a péptidos individuales.

Se observó liberación de histamina de basófilos de sangre periférica en respuesta tanto a tanto control positivo como a péptidos. La Tabla 1 muestra el porcentaje de individuos en los que se produjo liberación de histamina (como se define por los criterios de aceptación). La liberación de histamina a uno o más péptidos individuales se produjo frecuentemente, pero esto se tradujo frecuentemente en liberación de histamina de la mezcla de 7 péptidos preferidos. Sin embargo, un total del 5 % de los individuos presentó liberación de histamina en respuesta a la mezcla de péptidos. Los detalles de dosis y número de dosis consecutivas de mezcla de péptidos que produjeron la liberación de histamina son relevantes para la interpretación de estos resultados y se tratan en más detalles a continuación.

Tabla 2 – Visión general de la liberación de histamina por péptidos individuales

MLA01 (Relacionado con SEQ ID NO:1)	MLA03 (SEQ ID NO: 2)	MLA04 (SEQ ID NO: 3)	MLA05 (SEQ ID NO: 4)	MLA07 (SEQ ID NO: 5)	MLA12 (SEQ ID NO: 6)	MLA14 (SEQ ID NO: 7)	MLA15	MLA26
4	6	6	1	6	6	2	7	11

La Tabla 2 muestra el número de individuos en los que se detectó liberación de histamina en respuesta a cada péptido individual. MLA15 y MLA16 liberaron más comúnmente histamina.

3.2 Visión general del ensayo de proliferación

La Figura 3 resume las respuestas proliferativas a péptidos y antígenos. El porcentaje de individuos que generan una respuesta proliferativa detectable se muestra en las barras negras. Las barras grises (débil), blancas (moderada) y reticuladas (fuerte) proporcionan un análisis de la calidad de estas respuestas. La calidad se define arbitrariamente por el índice de estimulación (SI: relación de recuentos en presencia de antígeno/péptido divididos por recuentos en medio solo). Por tanto, para el péptido 1 (MLA01), el 12 % de los sujetos generaron una respuesta proliferativa y de esos el 92 % generó una débil, ninguno moderada y el 8 % generó una alta. Las respuestas proliferativas a péptidos/antígenos individuales fueron variables (barra negra). El 92 % de los sujetos tuvieron respuestas proliferativas positivas al antígeno de control positivo PPD. La mayoría de éstas fueron respuestas fuertes (barra reticulada). El 75 % de los sujetos respondieron a extracto de caspa de gato, siendo el 59 % de las respuestas (es decir, 59 % al 75 %) débiles. La respuesta a la mezcla de 7 péptidos preferidos (SEQ ID NO: 1 a 7) fue prácticamente idéntica a la del extracto de caspa de gato (CAT). Los péptidos MLA15 y MLA16 indujeron respuestas más frecuentes que cuatro de los péptidos preferidos. Sin embargo, MLA15 y MLA16 indujeron las respuestas de liberación de histamina por basófilos más frecuentes (véase la sección 3.1). Pocos péptidos individuales indujeron respuestas proliferativas fuertes como era de esperar (frecuencia de precursores baja de linfocitos T precursores específicos de péptido).

3.3 Visión general del ensayo de citocinas

La Figura 4 resume el porcentaje de individuos que generaron una respuesta detectable a cada uno de los péptidos/antígenos por producción de las tres citocinas medidas. Las barras negras representan la producción de IFN- γ , las barras grises de IL-13 y las barras blancas de IL-10. El antígeno de control positivo PPD provocó una producción de citocinas en casi todos los individuos (IFN- γ : 91 %, IL-13: 97 % e IL-10: 96 %) El alérgeno de gato completo y la mezcla de los 7 péptidos provocaron una respuesta de citocinas en aproximadamente el 80 % o más de los sujetos. Los péptidos individuales provocaron respuestas de frecuencia diferente. En general, pareció que la producción de citocinas era un método más sensible de detección de respuestas, dando porcentajes más grandes de individuos respuestas de citocinas positivas que respuestas proliferativas. En la mayoría de casos se detectó secreción de IL-10 en el mayor número de sujetos e IFN- γ se detectó menos frecuentemente.

3.4 Tipificación de tejido

Tabla 3

DRB1	1	3	4	7	8	11	12	13	14	15	16
%	6,4	14,7	15,7	8,8	3,4	8,3	3,9	14,7	2,9	17,6	2,5
Población de referencia %	9,4	11,1	12,8	13,2	3,7	13,4	2,3	10,2	3,2	10,7	3,6

5 Se realizó tipificación de tejido con el fin de garantizar que la población del estudio (predominantemente caucásica) era representativa de la población caucásica general en la que se usará la vacuna. Se muestran once familias de alelos de DRB1 comunes. Se muestran las frecuencias alélicas en 102 sujetos del estudio tipados, no el porcentaje de individuos que expresan un alelo, ya que cada individuo tiene dos alelos de DRB1 y algunos individuos son homocigotos para alelos particulares. También se muestran frecuencias alélicas de poblaciones de referencia para comparación (datos de HLA Facts Book, Parham & Barber). Las frecuencias de referencia se obtuvieron por análisis de estudios múltiples que indicaban las frecuencias y las cifras mostradas son valores medios. Todas las frecuencias detectadas en el presente análisis estuvieron dentro de los intervalos informados en los datos de referencia. Por tanto, la población examinada en el presente estudio es representativa de una población caucásica.

15 **4. Cifras**

4. Ensayo de liberación de histamina

Tabla 4 – Perfiles de sujetos individuales

Sujeto	Liberación espontánea (entre el 10 %-20 %)	Control positivo (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)		Péptido (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)		Mezcla de péptidos (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)		Comentarios:
		2 o más diluciones	Solo la concentración más alta	2 o más diluciones	Solo la concentración más alta	2 o más diluciones	Solo la concentración más alta	
002		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
007		Y	N	Y	N	N	N	MLA16
008		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
009		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
010		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
011 RECHAZO	30 %							LIBERACIÓN ESPONTÁNEA ALTA
012		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
013		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
014		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
015	13 %	N	Y	Y	N	N	N	MLA01, MLA04, MLA07, MLA15
016	12 %	Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
017		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
018		N	Y	N	N	N	N	Sin liberación
019 RECHAZO	47 %							LIBERACIÓN ESPONTÁNEA ALTA
020 RECHAZO	77 %							LIBERACIÓN ESPONTÁNEA ALTA
022		Y	N	Y	N	N	N	MLA01
023		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
024		N	N	N	N	N	N	Sin liberación (no positiva)
026		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
027		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
028		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
029		N	N	N	N	N	N	Sin liberación (no positiva)
030		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
031		Y	N	N	Y	N	N	MLA03, MLA12
032 RECHAZO	32 %							LIBERACIÓN ESPONTÁNEA ALTA
033		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
034		N	N	N	N	N	N	Sin liberación (no positiva)
035		N	Y	N	N	N	N	Sin liberación
040		N	Y	N	N	N	N	Sin liberación
041		N	N	N	N	N	N	Sin liberación (no positiva)
042		Y	N	N	N	N	N	Sin liberación
043		N	N	Y	N	N	N	MLA04 (no positiva)
044		Y	N	N	N	N	Y	MIX 28 %

MIX: mezcla de 7 péptidos (es decir, SEQ ID NOS: 1 a 7)									
Gris: Liberación de histamina a uno o más péptidos individuales de la mezcla preferida, o a la propia mezcla preferida. Comentarios: Esta columna enumera los péptidos individuales que dan lugar a la liberación de histamina / otros comentarios relevantes para cada sujeto.									
Sujeto	Liberación espontánea (entre el 10 %-20 %)	Control positivo (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	Péptido (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	Individual (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	Mezcla (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	de péptidos	Comentarios:		
046		N	N	N	N	N	MLA 16 (no positiva)		
047		Y	N	N	N	N	Sin liberación		
049		N	N	N	N	N	MLA03 MLA16 (no positiva)		
050		Y	N	N	N	N	Sin liberación		
051		Y	N	YMLA12	N	N	MLA12, MLA16		
052		N	Y	N	N	N	MLA16		
053		N	Y	N	N	N			
054 RECHAZO	54 %								RESULTADO NO INTERPRETABLE, ALTO FONDO DEL 40-50 % DE LIBERACIÓN
055		Y	N	N	Y	N			LIBERACIÓN DE MEZCLA EN 2 CONCENTRACIONES CONSECUTIVAS
056		Y	N	Y _{MLA16}	Y _{MLA03}	N			LIBERACIÓN DE MEZCLA EN 4 CONCS CONSEC
057		N	N	Y	N	N			MLA15 JUSTO POR ENCIMA DEL CORTE DEL 10 % (no positiva)
058		N	N	Y	N	N			MLA04 (no positiva)
059		Y	N	Y	N	N			MLA12 Y MLA16
060		N	N	N	N	N			SIN LIBERACIÓN (NO POSITIVA)
061		Y	N	N	N	N			SIN LIBERACIÓN
062		Y	N	Y _{MLA03}	Y _{MLA01,MLA15}	N			MLA03 MLA01
063		Y	N	N	N	N			SIN LIBERACIÓN
064 RECHAZO	33 %								LIBERACIÓN ESPONTANEA ALTA
065		Y	N	N	N	N			SIN LIBERACION
066		Y	N	N	N	N			SIN LIBERACION
067		Y	N	N	N	N			SIN LIBERACION
068		N	N	N	N	N			SIN LIBERACION (NO POSITIVA)
069		Y	N	N	Y	N			MLA03, MLA05, MLA07 MLA12
070		Y	N	Y _{MLA04,14,15}	Y _{MLA07,12,16}	N			MLA04, MLA07, MLA12, MLA14, MLA15, MLA16
071		Y	N	N	N	N			SIN LIBERACION
072		Y	N	N	N	N			SIN LIBERACION
073		Y	N	N	Y	N			MLA03
076		N	N	N	N	N			SIN LIBERACION (NO POSITIVA)
080		Y	N	N	N	N			SIN LIBERACION
081		N	N	N	N	N			SIN LIBERACION(NO POSITIVA)
082		Y	N	N	Y _{MLA16}	N			MLA16

MIX: mezcla de 7 péptidos (es decir, SEQ ID NOS: 1 a 7)										
Gris: Liberación de histamina a uno o más péptidos individuales de la mezcla preferida, o a la propia mezcla preferida.										
Comentarios: Esta columna enumera los péptidos individuales que dan lugar a la liberación de histamina / otros comentarios relevantes para cada sujeto.										
Sujeto	Liberación espontánea (entre el 10 %-20 %)	Control positivo (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	Péptido (liberación encima del nivel inicial)	Peptido individual (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	Mezcla (liberación encima del nivel inicial)	Mezcla de péptidos (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	Comentarios:			
083 RECHAZO	39 %						ENSAYO NO INTERPRETABLE			
084 RECHAZO	37 %						ENSAYO NO INTERPRETABLE (FONDO MUY ALTO)			
085		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
086		N	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN (NO POSITIVA)			
087		N	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN (NO POSITIVA)			
088		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
089		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
090		Y	N	Y _{MLA03}	N	N	MLA03, MLA07			
091		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
092	10,6 %	Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
093 RECHAZO	29 %						LIBERACIÓN ESPONTÁNEA ALTA			
094		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
095		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
096		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
097 RECHAZO							ENSAYO NO INTERPRETABLE (PARECE SER UN RECUENTO DE LIBERACIÓN TOTAL FALSAMENTE BAJO)			
099		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
100	11,5 %	Y	Y	N	N	N	MLA15			
101		N	N	Y	N	N	MLA07, MLA14, MLA15, MLA16 NO POSITIVA			
103		Y	N	Y	N	Y	MLA01, MLA04, MLA15, MIX			
104		Y	N	Y	N	N	MLA012			
105 RECHAZO	28 %						LIBERACIÓN ESPONTÁNEA ALTA			
106 RECHAZO	41 %						LIBERACIÓN ESPONTÁNEA ALTA			
107 RECHAZO	35 %						LIBERACIÓN ESPONTÁNEA ALTA			
108		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
109		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			
111		Y	N	N	N	N	MLA07			
112		Y	N	Y	N	N	MLA04, MLA16			
113		N	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN (NO POSITIVA)			
117		N	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN (NO POSITIVA)			
118		Y	N	N	N	N	SIN LIBERACIÓN			

MIX: mezcla de 7 péptidos (es decir, SEQ ID NOS: 1 a 7) Gris: Liberación de histamina a uno o más péptidos individuales de la mezcla preferida, o a la propia mezcla preferida. Comentarios: Esta columna enumera los péptidos individuales que dan lugar a la liberación de histamina / otros comentarios relevantes para cada sujeto.					
Sujeto	Liberación espontánea (entre el 10 %-20 %)	Control positivo (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	Péptido individual (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	Mezcla de péptidos (liberación del 10 % por encima del nivel inicial)	Comentarios:
% de sujetos que muestran liberación	70,4	7,4	17,3	2,5	2,5

Se completaron un total de 94 ensayos de liberación de histamina durante el estudio. De éstos se rechazaron 13 ensayos principalmente debido a niveles inaceptablemente altos de liberación espontánea. Se rechazaron los ensayos con liberación de histamina espontánea del 20 % o más de la liberación de histamina total. Aquellos ensayos con una liberación espontánea de entre el 10 % y el 20 % se indican en la Tabla 4. Todos los otros ensayos tuvieron valores de liberación espontánea de menos del 10 %.

Aproximadamente el 78 % de los sujetos ensayados demostraron liberación de histamina positiva al alérgeno sensibilizante. La bibliografía existente indica que el 10-20 % de los individuos alérgicos son resistentes a liberación de histamina por basófilos inducida por alérgeno.

La liberación de histamina se consideró positiva si (a) la concentración más alta de péptido solo indujo la liberación del 10 % o más del valor de liberación total o (b) si dos valores consecutivos fueron el 10 % o más de la liberación total. Aproximadamente el 31 % (25/81) de los sujetos mostró liberación de histamina a uno o más péptidos individuales. De estos, 6/81 (7,4 %) no tuvieron liberación de control positivo al extracto de alérgeno de gato completo.

En dos individuos, la mezcla de los 7 péptidos también indujo la liberación de histamina, además de ciertos péptidos individuales. En dos individuos adicionales, solo la mezcla de los 7 péptidos indujo liberación. Por tanto, 4/81 individuos (~5 %) presentaron liberación de histamina con la mezcla de péptidos.

El sujeto 044 mostró liberación (28 % de la liberación total) a la concentración más alta (10 ug/ml) de péptido solo. El sujeto 055 mostró liberación a 0,1 ug/ml (72 % del total) y 1 ug/ml (47 % del total) solo. El sujeto 056 mostró liberación a 0,01 ug/ml (11 %), 0,1 ug/ml /ml (12 %), 1,0 ug/ml (17 %) y 10 ug/ml (10 ug/ml). El sujeto 103 mostró liberación de histamina (33 %) a la concentración más alta (10 ug/ml) de péptido solo.

4.2 Ensayo de proliferación

Para el ensayo de proliferación se analizaron los datos de proliferación individuales para todos los sujetos y todas las concentraciones de péptidos. Se resumieron los índices de estimulación para cada péptido/antígeno para la población total de 100 sujetos.

Antígenos complejos tales como extracto de caspa de gato y PPD inducen respuestas proliferativas significativas en la población como un total. Los péptidos que inducen respuestas significativas son aquellos que provocan respuestas proliferativas en un porcentaje mayor de la población.

Los índices de estimulación de menos de 1 surgen cuando los recuentos en los pocillos que contienen péptidos son más bajos que los que contienen medio de cultivo solo. Tal efecto puede ser atribuible a ligeros cambios en el pH tras la adición de péptidos que se preparan en solución ácida. La ausencia de una respuesta proliferativa al péptido produciría entonces recuentos ligeramente más pequeños que aquellos en los pocillos de medio solo.

4.3 Ensayo de liberación de citocinas

Las Figuras 4 a 7 muestran, para cada péptido/antígeno, el porcentaje de individuos que generaron una respuesta de cualquier magnitud detectable (es decir, producción de IFN- γ , IL-13 o IL-10 detectables). La intensidad de aquellas respuestas se divide después en cuatro niveles de producción de citocinas. Por ejemplo, el 35 % de la población del estudio puede haber generado una respuesta de IFN- γ . Del 35 % de los individuos, la mitad (50 %) generaron una respuesta muy débil, el 20 % una respuesta débil, el 15 % una respuesta moderada y el 15 % una respuesta fuerza (dando un total del 100 % de respondedores). Los límites de cada nivel de citocinas se asignaron arbitrariamente basándose en el intervalo de detección del ensayo de ELISA. Los límites son diferentes entre IFN- γ /IL-10 e IL-13 ya que para IFN- γ e IL-10 el intervalo de detección fue aproximadamente de 1-100 pg/ml mientras que el intervalo para el ensayo de IL-13 fue aproximadamente de 0,5-50 pg/ml.

4.3.1 Producción de interferón γ

La Figura 5 muestra el porcentaje de individuos que producen IFN- γ y la intensidad de la respuesta tras el cultivo celular con péptido/antígeno. Las respuestas de IFN- γ se detectaron entre el 26-44 % de los sujetos en respuesta a péptidos individuales. Estas respuestas fueron predominantemente de muy bajas a bajas a moderadas. Los antígenos complejos indujeron respuestas más frecuentes (mezcla de péptidos 80 %, caspa de gato 79 %, PPD 91 %). Estas respuestas fueron de bajas a moderadas a altas. Las respuestas de PPD fueron particularmente altas (89 de las respuestas de PPD estuvieron por encima de 100 pg/ml).

4.3.2 Producción de IL-13

La Figura 6 demuestra el porcentaje de individuos que producen IL-13 y la intensidad de la respuesta tras el cultivo celular con péptido/antígeno. Las respuestas de IL-13 se detectaron entre el 33-68 % de los sujetos en respuesta a

péptidos individuales. Estas respuestas fueron predominantemente de muy bajas a bajas, aunque se detectó un número significativo de respuestas moderadas. Esto puede reflejar la naturaleza de Th2 de sensibilización alérgica en estos sujetos. Los antígenos complejos indujeron respuestas más frecuentes (mezcla de péptidos 85 %, caspa de gato 93 %, PPD 97 %). Estas respuestas fueron de bajas a moderada a altas.

4.3.3 Producción de IL-10

La Figura 7 demuestra el porcentaje de individuos que producen IL-10 y la intensidad de respuesta tras el cultivo celular con péptido/antígeno. Las respuestas de IL-10 se detectaron entre el 46-75 % de los sujetos en respuesta a péptidos individuales. Estas respuestas fueron predominantemente de muy bajas a bajas. Los antígenos complejos indujeron respuestas más frecuentes (mezcla de péptidos 93 %, caspa de gato 96 %, PPD 96 %). Estas respuestas fueron de bajas a moderadas. Se observaron muy pocas respuestas de IL-10 "altas".

5. Discusión

5.1 Ensayo de liberación de histamina

En la interpretación de los resultados de liberación de histamina es importante considerar varios puntos en relación con el diseño del ensayo:

1) La dosis de sangre estimada de péptidos que se conseguirá durante el tratamiento está hacia el fondo de la curva de respuesta a dosis empleada en el ensayo. Por ejemplo, una dosis de 10 µg de péptido que entra en un volumen en sangre de 5 litros produciría una concentración de sangre de 2 ng/ml (2×10^{-6} mg/ml; esto supone que no se degrada péptido, que es poco probable). Esta concentración está justo por encima del límite de dosis inferior del ensayo (1 ng/ml). Las 2 concentraciones más bajas de péptido usadas en el ensayo se corresponden aproximadamente con dosis inyectadas de 5 µg (1 ng/ml) y 50 µg (10 ng/ml). Por tanto, el ensayo se diseña para detectar la liberación de histamina a o por encima de dosis del péptido usadas para la terapia. En solo 3 casos la liberación de histamina estuvo asociada con las dos concentraciones más bajas (valores consecutivos por encima del 10 %) de péptido. En dos de estos casos los valores fueron menores del 11 %. La mezcla de 7 péptidos no mostró ninguna liberación a las 2 concentraciones más bajas de péptido. Por tanto, aunque la liberación de histamina en respuesta a péptidos individuales o la mezcla fue relativamente común, generalmente no se observó a las concentraciones de péptido que se alcanzarán durante la terapia.

2) Por razones de coste y complejidad, solo se ensayaron pocillos individuales para cada concentración de péptido. Esto aumenta el riesgo de que uno cualquiera de los valores pueda ser falso. Esto es particularmente relevante para la segunda condición definida para un resultado positivo; que la concentración más alta sola de péptido/antígeno muestra liberación del 10 % o más de la liberación total. Varios casos de liberación de histamina a péptidos individuales se asociaron solo con la concentración más alta individual de péptido y esto también fue válido para 2/4 individuos con liberación de histamina provocada por la mezcla de 7 péptidos.

3) En algunos casos, la liberación de histamina de péptidos no se asoció con liberación de histamina de extracto de caspa de gato (ausencia de control positivo).

4) Anteriormente se mostró que péptidos con residuos de cisteína (MLA01, MLA04, MLA05, MLA12 y MLA15) eran capaces de variar los grados de homodimerización. Aunque no se cuantificó formalmente, también es probable que cuando estos péptidos se mezclen formen heterodímeros (es decir, dentro de la mezcla de SEQ ID NO: 1 a 7). Los dímeros pueden ser suficientes para el entrecruzamiento de moléculas de IgE en la superficie de mastocitos y basófilos dando lugar a la liberación de histamina. No se usaron excipientes para reducir la formación de enlaces disulfuro entre péptidos homólogos o heterólogos en este estudio. Las preparaciones clínicas de la vacuna contendrán tioglicerol para bloquear la formación de enlaces disulfuro.

Aproximadamente el 78 % de los sujetos ensayados demostraron liberación de histamina positiva al alérgeno sensibilizante. Esto es ligeramente menor que los informes en la bibliografía, que sugieren que el 10-20 % de los individuos alérgicos son resistentes a la liberación de histamina por basófilos inducida por alérgenos.

El 30,9 % de los sujetos mostró liberación de histamina frente a uno o más péptidos individuales. La liberación de histamina también se detectó en el 5 % de los sujetos (4/81) a la mezcla de 7 péptidos (SEQ ID NO: 1 a 7; probables candidatos a vacuna). Dos de esos 4 individuos presentaron liberación a péptidos individuales y 2 no lo hicieron. En varios sujetos que muestran liberación de histamina a péptidos individuales (6/81; 7,4 %), la liberación solo se produjo con el péptido MLA15 o MLA16, que no están incluidos en la mezcla de SEQ ID NO: 1 a 7. MLA16 fue el péptido que más frecuentemente se asoció a la liberación de histamina. Ajustando los valores para la liberación de péptidos individuales para incluir solo aquellos péptidos en los 7 candidatos a vacuna preferidos, el 23,5 % de los sujetos presentaron liberación de histamina a componentes individuales de la vacuna.

5.2 Ensayo de proliferación

Se ensayó la proliferación de CMSP en respuesta al cultivo con 3 concentraciones de péptidos individuales, una mezcla de 7 péptidos (seleccionada por ensayos de unión de MHC) y extracto de alérgeno de caspa de gato completo. También se midieron las respuestas a PPD a una concentración única como marcador de una respuesta

de memoria positiva.

Respuestas a PPD: El 92 % de los sujetos generaron una respuesta proliferativa detectable a PPD. La respuesta es ampliamente dependiente de la vacunación anterior con BCG. Los no respondedores pueden proceder de países en los que BCG no es obligatorio (por ejemplo, EE.UU.) o puede que no hayan recibido la inmunización por otras razones. La mayoría de respuestas (92 %) produjeron un SI de más de 10. Éstas se asignaron arbitrariamente como respuestas "fuertes".

Respuestas a extracto de alérgeno de caspa de gato: El 75 % de los sujetos generaron una respuesta proliferativa detectable a extracto de alérgeno de caspa de gato. Se detectaron respuestas más frecuentes mediante la medición de citocinas destacando la importancia de ensayar múltiples parámetros de activación para determinar la reactividad. La mayoría de las respuestas fueron débiles (SI 2-5; 59 %), aunque se observaron números significativos de respuestas moderadas (SI 5-10; 24 %) y fuertes (SI 10+; 17 %).

Mezcla de péptidos (P1-7): El 71 % de los sujetos generaron una respuesta a la mezcla de péptidos, similar al extracto de alérgeno de caspa de gato. Se observó un porcentaje similar de respuestas débiles (52 %), moderadas (34 %) y fuertes (14 %). Las respuestas proliferativas al extracto de alérgeno de caspa de gato y la mezcla de péptidos se correlacionaron estrechamente, indicando que la mayoría de la reactividad de los linfocitos T a caspa de gato puede explicarse por los epítopes contenidos dentro de la mezcla de péptidos.

Respuestas a péptidos individuales: Las respuestas proliferativas a péptidos individuales fueron generalmente de débiles a moderadas. La mayoría de péptidos generaron el 70-80 % de sus respuestas en la categoría de débiles, con el 20-30 % en la categoría de moderadas. Pocos péptidos provocaron respuestas fuertes. Las respuestas más débiles frente a péptidos individuales que a antígenos complejos o mezclas de péptidos es un hallazgo esperado que resulta de frecuencias de precursores más bajas de linfocitos T específicos para epítopes individuales.

Las respuestas proliferativas más fuertes a un péptido individual fueron a P12 de la cadena 2 de Fel d1 (43 %) y las más débiles a P4 de la cadena 1 (6 %). Sin embargo, se detectaron respuestas de citocinas a todos los péptidos más frecuentemente que respuestas proliferativas.

5.3 Ensayos de citocinas

Se demostró que la medición de citocinas era el método más sensible de medición de respuestas a los péptidos. Generalmente, un porcentaje más alto de sujetos presentaron respuestas de citocinas medibles en comparación con respuestas proliferativas medibles. La producción de cada una de las tres citocinas varió, siendo IL-10 generalmente producida por una mayor proporción de sujetos que IL-13 e IFN- γ . La frecuencia más baja de respuesta se detectó con IFN- γ . El estado alérgico atópico de estos sujetos es probable que signifique que la respuesta de linfocitos T de memoria a Fel d1 y sus epítopes será dominada por respuestas Th2 que pueden explicar la respuesta Th1 (IFN- γ) menos frecuente. La alta frecuencia de respuestas de IL-10 fue una sorpresa. Se considera que IL-10 es una citocina Th2 en el sistema murino, pero esto no está bien establecido en el sistema humano. IL-10 se considera generalmente una citocina reguladora/inmunosupresora. Informes previos han sugerido que algunas secuencias de péptidos pueden tener propiedades de inducción de IL-10 intrínsecas. Tales péptidos no se observaron en este estudio. La detección de tales respuestas en otros sistemas puede reflejar simplemente la naturaleza de sensibilización de linfocitos T a alérgeno completo que se recuerda por cultivo de linfocitos T de memoria con péptido. Por tanto, la producción de IL-10 puede ser una respuesta de memoria en lugar del resultado de características de inducción de IL-10 intrínsecas del péptido.

Ningún péptido individual indujo la producción preferencial de una citocina particular. Por tanto, ninguno de los péptidos cribados indujo una respuesta de Th2 (IL-13) particularmente desfavorable que habría sido considerada no deseable para la inclusión en la vacuna de péptido.

5.4 Tipificación de tejido

Los resultados de la *Tipificación* de tejido muestran que en este estudio se ensayó que una población representativa.

6. Conclusión

6.1 Ensayo de liberación de histamina

Péptidos individuales indujeron la liberación de histamina en algunos individuos. La mezcla de péptidos preferidos SEQ ID NO: 1 A 7 indujo la liberación de histamina en 4 individuos, aunque en 2 de estos la liberación se detectó en un único punto (concentración más alta). MLA16 provocó la liberación más frecuente, pero está ausente de SEQ ID NO: 1 A 7. Se observó alguna liberación positiva con péptidos en ausencia de "liberación de control positivo" de caspa de gato completa. El ensayo se diseñó para detectar la liberación de histamina a concentraciones de péptido que se aproximan a las dosis de tratamiento y mayores. La liberación de histamina a concentraciones de péptido que se corresponden con las dosis de tratamiento fue extremadamente rara (solo un ejemplo claro) y solo se produjo

con péptidos individuales, no con SEQ ID NO: 1 A 7.

Es probable que los resultados del ensayo de liberación de histamina *in vitro* sobrerrepresenten el potencial de liberación de histamina de la vacuna ya que no se realizó ninguna etapa para minimizar la formación de enlaces disulfuro entre péptidos.

La histamina se liberó por basófilos de la mayoría de los individuos en presencia de extracto de caspa de gato completo. La liberación de histamina se produjo de un modo dependiente de la dosis en muchos sujetos, a diferencia de la liberación con péptidos que frecuentemente se produjo a concentraciones en la mitad del intervalo de dosificación. En individuos en los que la histamina se liberó por péptidos, la sensibilidad al extracto de caspa de gato fue normalmente evidente a dosis más bajas de extracto.

6.2 Ensayo de proliferación

Las respuestas proliferativas a péptidos fueron más débiles que a las mezclas de péptidos o antígenos de proteínas complejos como era de esperar. La mayoría de los péptidos individuales provocaron respuestas proliferativas en menos del 20 % de los individuos. Se observó una variación considerable entre los péptidos, pero ningún péptido individual dejó de provocar respuestas proliferativas en al menos algunos sujetos, aunque uno de los 7 péptidos preferidos, MLA04, produjo una baja inducción de la proliferación. Los péptidos MLA15 y MLA16 fueron más potentes en la inducción de la proliferación que varios de los 7 péptidos preferidos, pero proporcionaron la liberación de histamina más alta.

6.3 Ensayos de citocinas

La producción de citocinas fue un método más sensible que la proliferación para detectar respuestas a péptidos en este estudio. No se tuvo evidencia para soportar la idea de que ciertos péptidos pueden tener una capacidad intrínseca de inducir un patrón particular de producción de citocinas. Ningún péptido individual produjo preferencialmente una respuesta Th1, Th2 o Treg (IL-10). Las respuestas de IFN- γ tendieron a ser menos comunes que las de IL-13 e IL-10. Los datos de ensayos de citocinas no indican que ninguna de las mezclas de péptidos preferidas se sustituya ni que ninguno de los péptidos individuales o la mezcla induzca preferencialmente una respuesta de Th2 *in vivo*.

Ejemplo 3: Ensayo clínico de la combinación preferida

Se ha probado una mezcla preferida de 7 péptidos que consiste en los péptidos de SEQ ID NO: 1 a 7 en un ensayo clínico ciego controlado por placebo aleatorizado. Se evaluó la eficacia de esta mezcla en reducir los síntomas de alergia. El diseño del estudio del ensayo clínico estuvo de acuerdo con las directrices de buena práctica clínica.

Se establecieron respuestas cutáneas iniciales a los alérgenos de gato para todos los sujetos usando una exposición inicial que tuvo lugar entre 6 y 8 días antes de la administración de la medicación del estudio. Se administraron dos inyecciones intradérmicas de 0,010 unidades de HEP (punción equivalente de histamina) de alérgeno de gato patrón comercialmente disponible (suministrado por Laboratorios Leti, España), separadas por un intervalo de tiempo de 30 minutos, en la superficie volar de los antebrazos izquierdo y derecho, respectivamente. Se evaluaron los sujetos para garantizar que experimentaban una respuesta cutánea de fase tardía (LPSR) al alérgeno de gato completo y la magnitud de la reacción inicial se registró del siguiente modo:

Ocho horas después de cada inyección se dibujó el perfil de cualquier respuesta de fase tardía sobre la piel con un bolígrafo. Se midieron los diámetros más largos y ortogonales y se registraron para cada respuesta, y se calculó el área de la respuesta en cada brazo. A continuación se calculó el área promedio de respuesta en ambos brazos de cada sujeto para proporcionar la reacción inicial. Los sujetos que produjeron una reacción inicial adecuada se asignaron a grupos de dosificación, se aleatorizaron y se introdujeron en la fase de tratamiento.

La fase de tratamiento consistió en un periodo de 21 días para cada sujeto. Durante este periodo, un grupo de sujetos recibió una inyección intradérmica única de o bien la mezcla preferida (0,03, 0,3, 3, 12 nmoles de cada péptido por dosis) o bien placebo diluyente en la visita de fase de tratamiento 1 el día uno. Una cohorte de 8 sujetos recibió tratamiento a cada nivel de dosis (6 recibieron la mezcla preferida y 2 placebo). La primera cohorte del grupo intradérmico recibió 0,03 nmoles de cada péptido en la mezcla y cada cohorte posterior en el grupo recibió el siguiente nivel de dosis más alto.

Se hicieron inyecciones intradérmicas en la superficie flexora del antebrazo izquierdo. El volumen total de la inyección fue 60 μ l para todas las inyecciones. Después del tratamiento, la respuesta cutánea de los sujetos al alérgeno completo se volvió a probar en la visita de fase de tratamiento 2 el día 21 (\pm 3 días). Las respuestas cutáneas al alérgeno de gato se evaluaron por medición de las respuestas de fase tardía 8 horas tras la administración intradérmica de 0,010 unidades de HEP (punción equivalente de histamina) de alérgenos de gato patrón comercialmente disponible (suministrado por Laboratorios Leti, España) como se describe anteriormente. A

continuación se calculó el área promedio de respuesta para ambos brazos de cada sujeto como se describe anteriormente.

- 5 A continuación se comparó esta área de LPSR promedio después del tratamiento con el área de LPSR inicial para cada sujeto. Entonces se evaluó el cambio global en el área LPSR para los ocho pacientes en cada cohorte. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla a continuación. Este análisis se realizó sin desenmascarar los datos.

DOSIS (nmol)	REDUCCIÓN EN EL ÁREA DE LPSR DESPUÉS DEL TRATAMIENTO
0,03	+
0,3	++
3,0	++
12,0	++

- 10 La Figura 8 es una representación representativa que muestra el área de LPSR promedio antes y después del tratamiento para los ocho pacientes en la cohorte de 12,0 nmoles. En conjunto, estos datos indican que la mezcla preferida de péptidos es eficaz en reducir LPSR al alérgeno completo en individuos alérgicos a los gatos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en un método de prevención o tratamiento de alergia a los gatos en un individuo, composición que comprende:

5

(a) como únicos componentes terapéuticos:

10

- el polipéptido que consiste en la secuencia APCVKRDVDFLFT (SEQ ID NO: 1);
- el polipéptido que consiste en la secuencia EQVAQYKALPVVLENA (SEQ ID NO: 2);
- el polipéptido que consiste en la secuencia KALPVVLENARILKNCV (SEQ ID NO: 3);
- el polipéptido que consiste en la secuencia RILKNCVDAKMTEEDKE (SEQ ID NO: 4);
- el polipéptido que consiste en la secuencia KENALSLLDKIYTSPL (SEQ ID NO: 5);
- el polipéptido que consiste en la secuencia TAMKKIQDCYVENGLI (SEQ ID NO: 6); y
- el polipéptido que consiste en la secuencia SRVLDGLVMTTISSSK (SEQ ID NO: 7);

15

y

(b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que uno o más de los polipéptidos tiene una o más modificaciones seleccionadas de las siguientes:

20

- (i) acetilación del extremo N;
- (ii) amidación del extremo C;
- (iii) uno o más hidrógenos en las aminas de cadena lateral de arginina y/o lisina sustituidos con un grupo metileno;
- (iv) glucosilación; y
- (v) fosforilación.

25

3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, que se proporciona como una solución, suspensión o emulsión inyectable.

30

4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que cada dicho polipéptido está en solución a una concentración en el intervalo de 0,03 a 200 nmol/ml.

35

5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que cada dicho polipéptido está en solución a una concentración en el intervalo de 0,3 a 200 nmol/ml.

6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichos polipéptidos comprenden al menos el 90 % de las proteínas presentes en la preparación.

40

7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho método comprende administrar dicha composición a un individuo mediante inyección, por inhalación, por las vías oral, parenteral, subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica o por técnicas de infusión.

45

8. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho individuo es un ser humano.

9. Una composición farmacéutica que comprende como únicos componentes terapéuticos los polipéptidos como se define en las reivindicaciones 1 o 2 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

50

10. La composición según la reivindicación 9, que se proporciona como una solución, suspensión o emulsión inyectable.

11. La composición según la reivindicación 9 o 10, en la que cada dicho polipéptido está en solución a una concentración en el intervalo de 0,03 a 200 nmol/ml.

55

12. La composición según la reivindicación 9 o 10, en la que cada dicho polipéptido está en solución a una concentración en el intervalo de 0,3 a 200 nmol/ml.

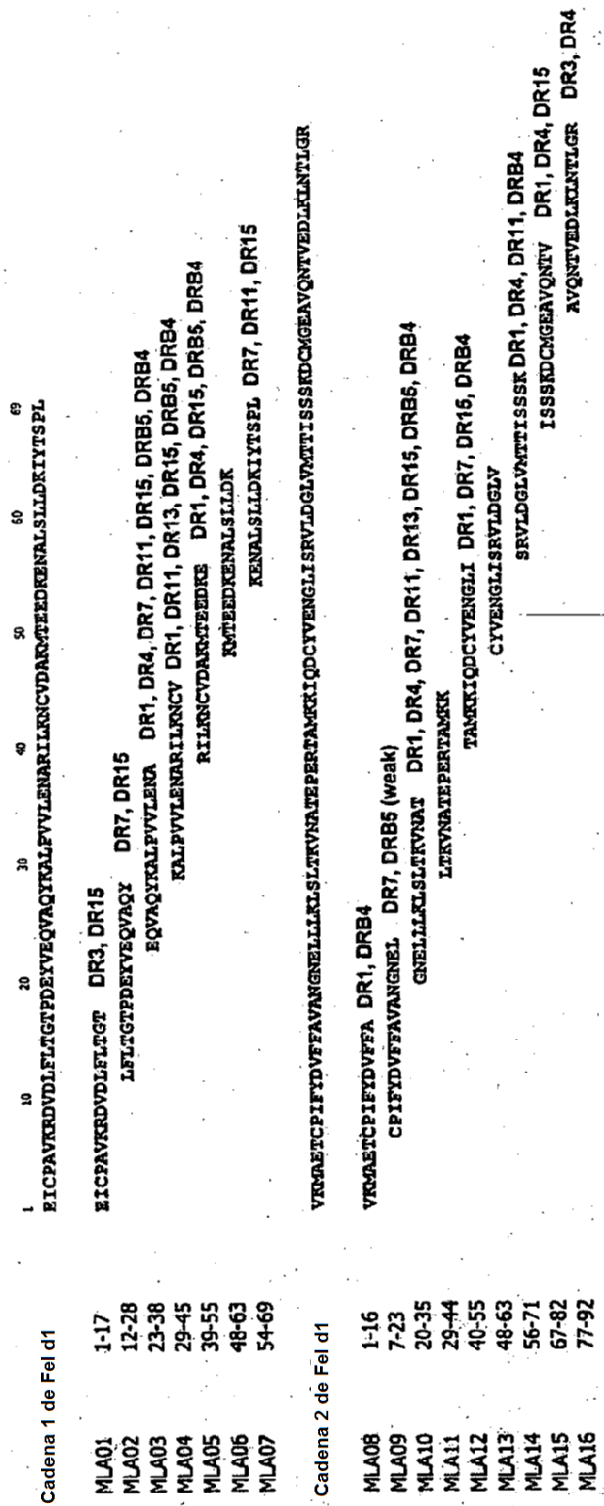
60

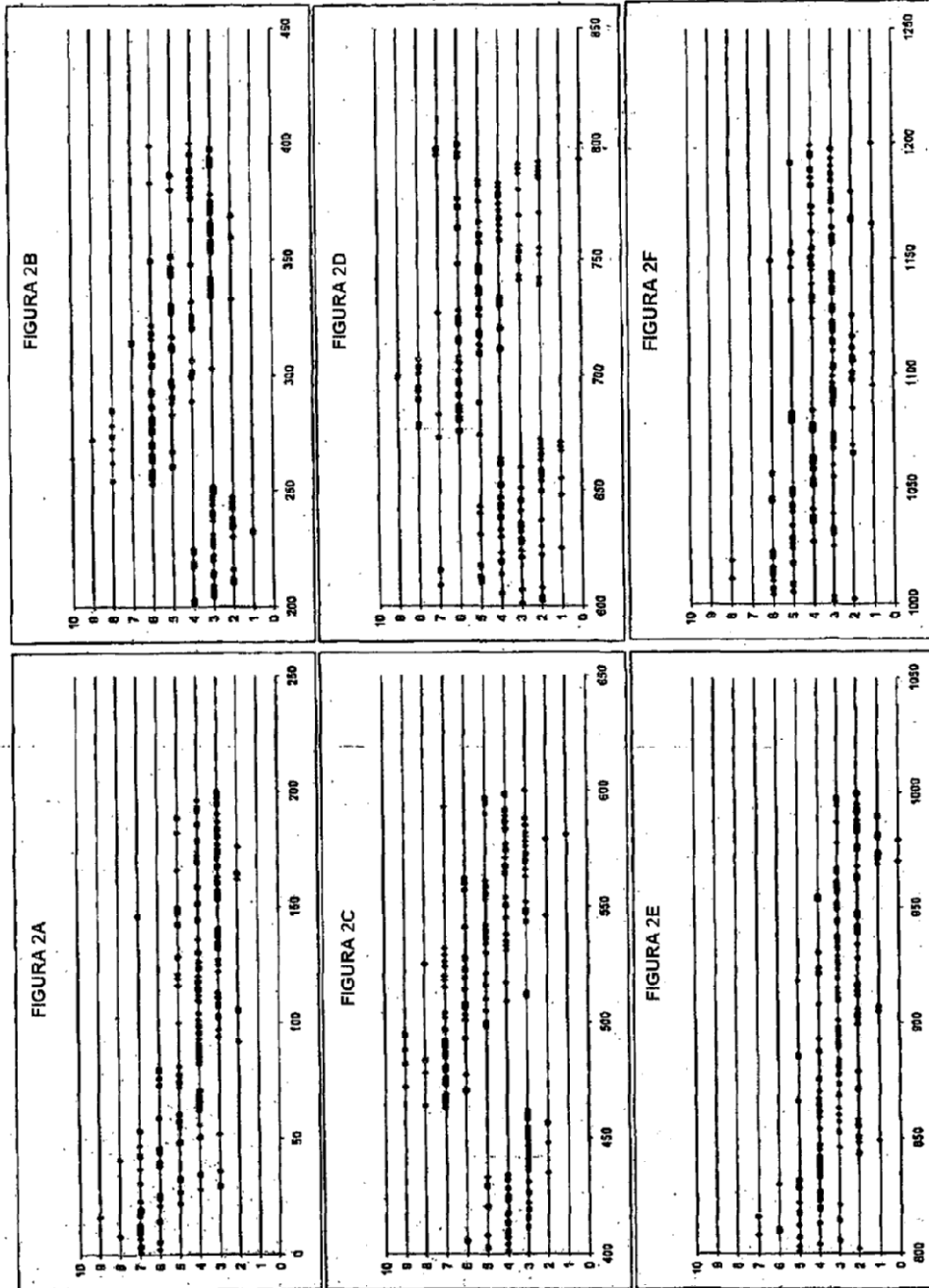
13. Un método de preparación de una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 9, que comprende combinar dichos polipéptidos con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

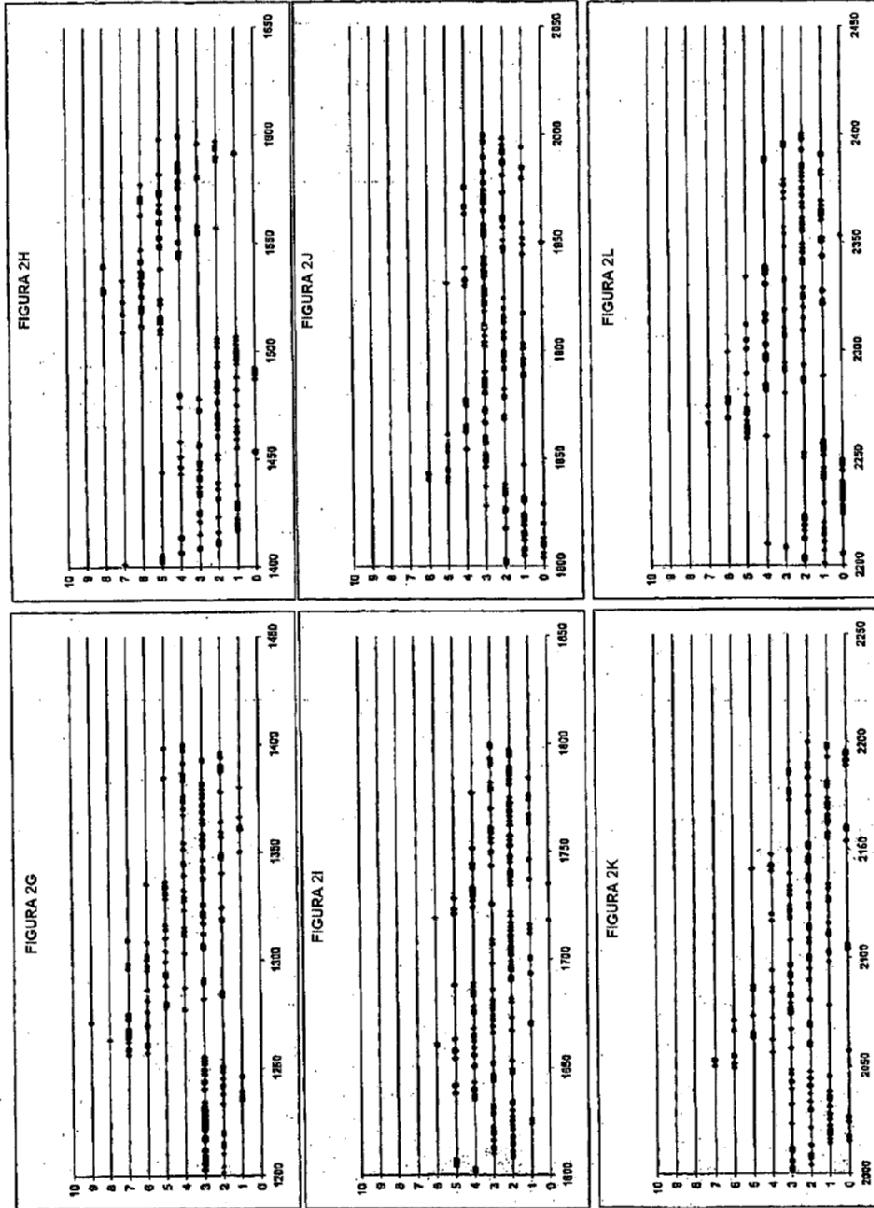
14. Un método según la reivindicación 13 para preparar una composición para administración parenteral que comprende proporcionar dichos polipéptidos en forma deshidratada y reconstituir dichos polipéptidos con dicho vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

65

Figura 1







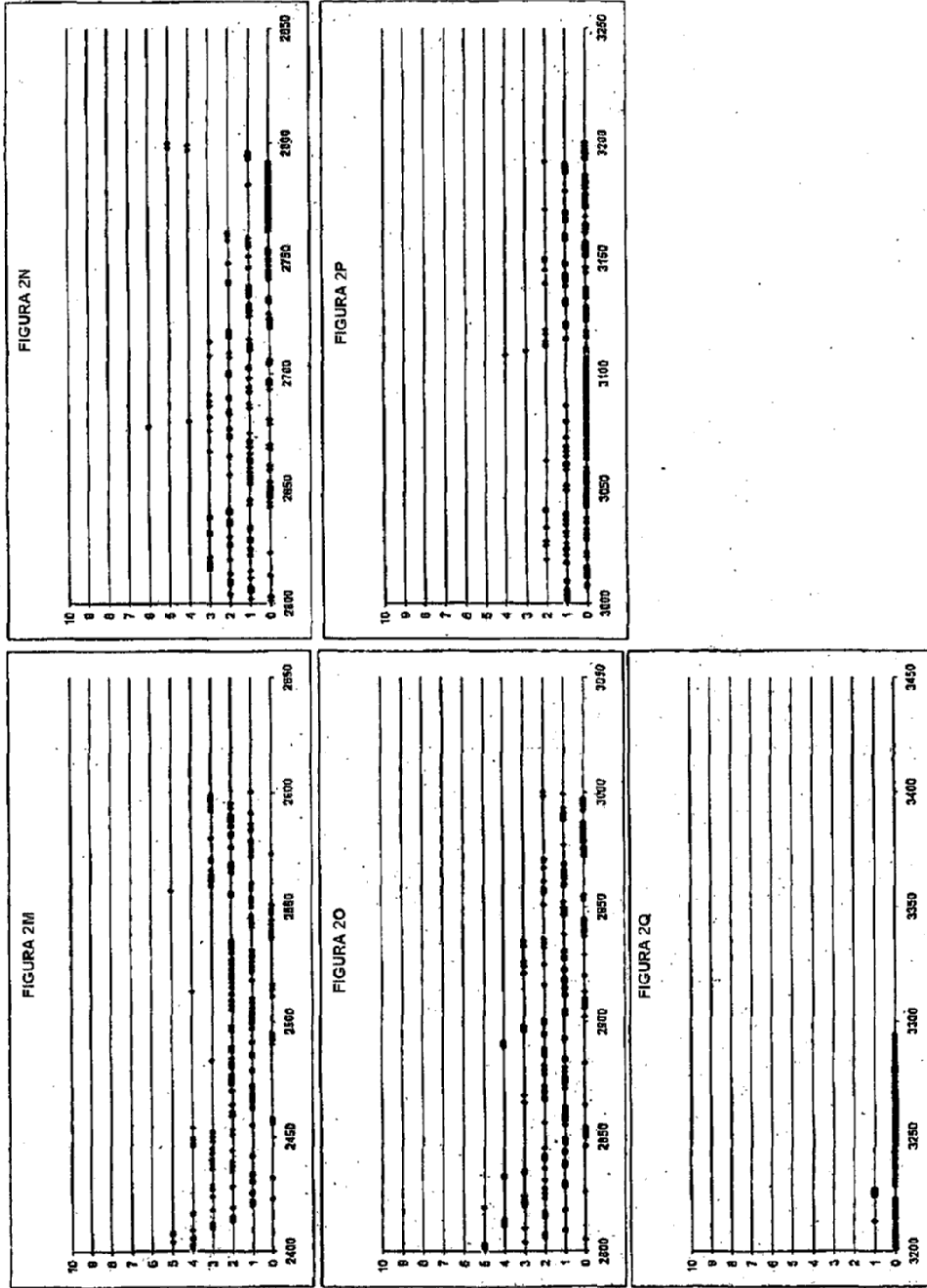


Figura 3

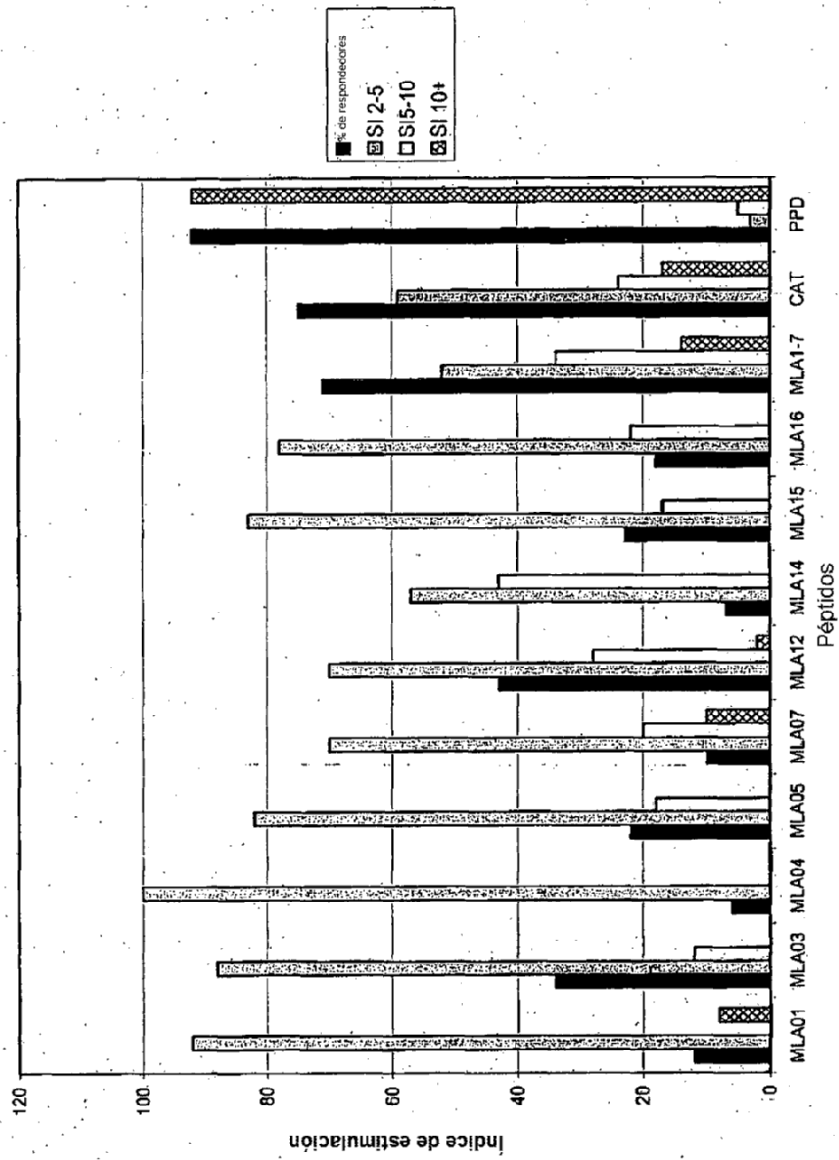


Figura 4

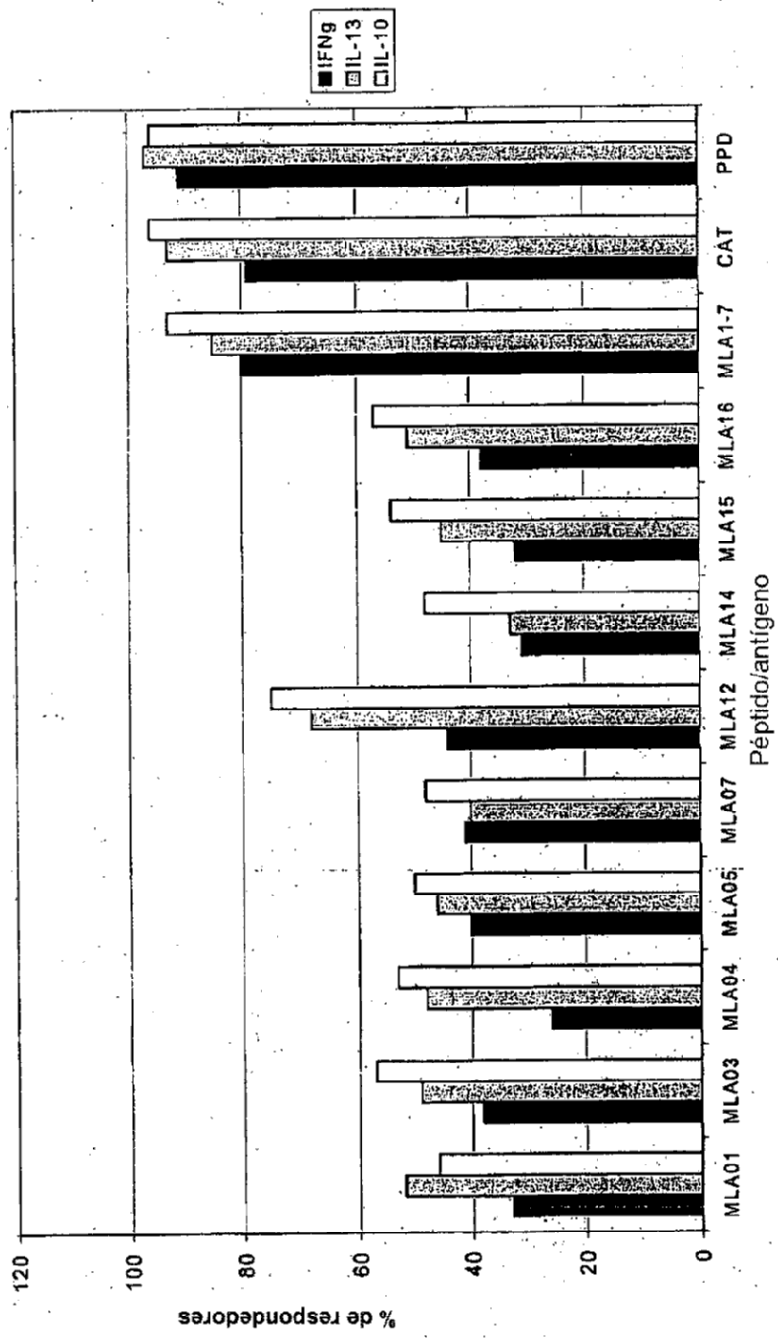


Figura 5

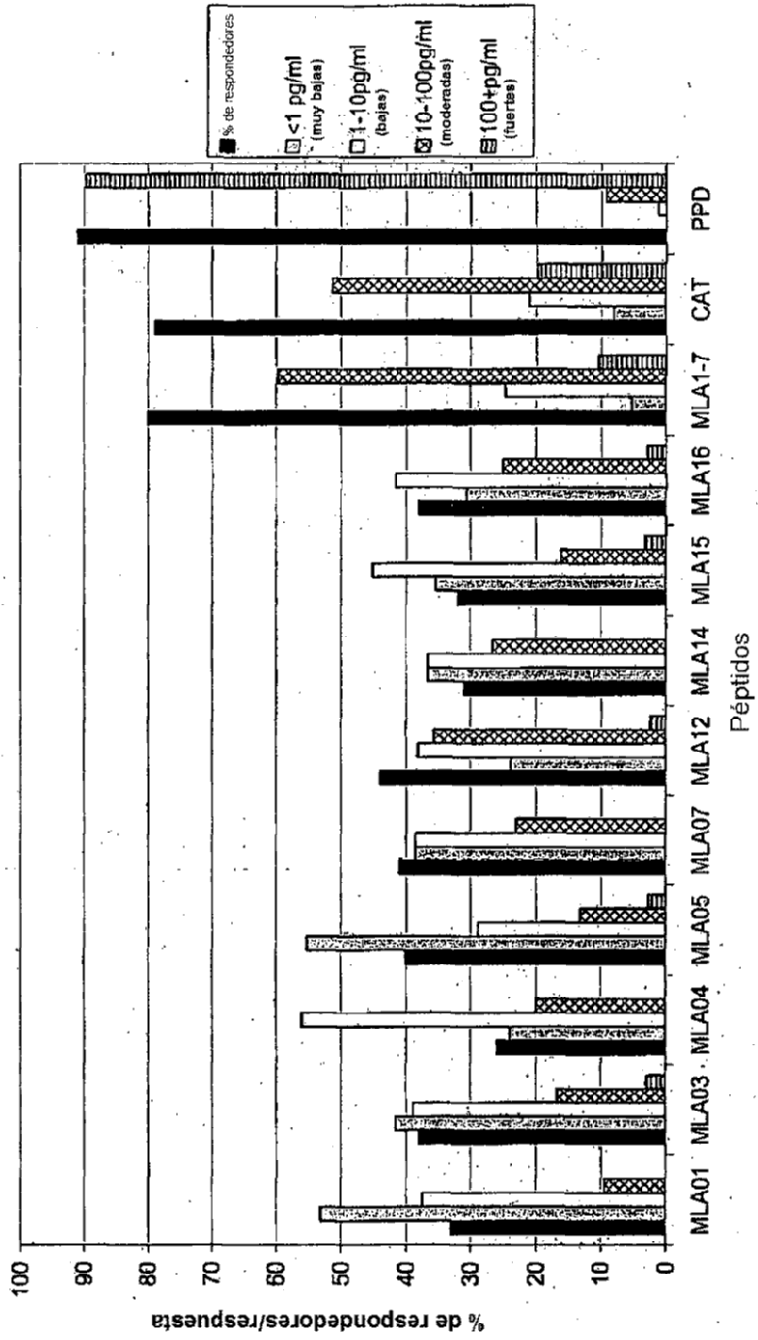


Figura 6

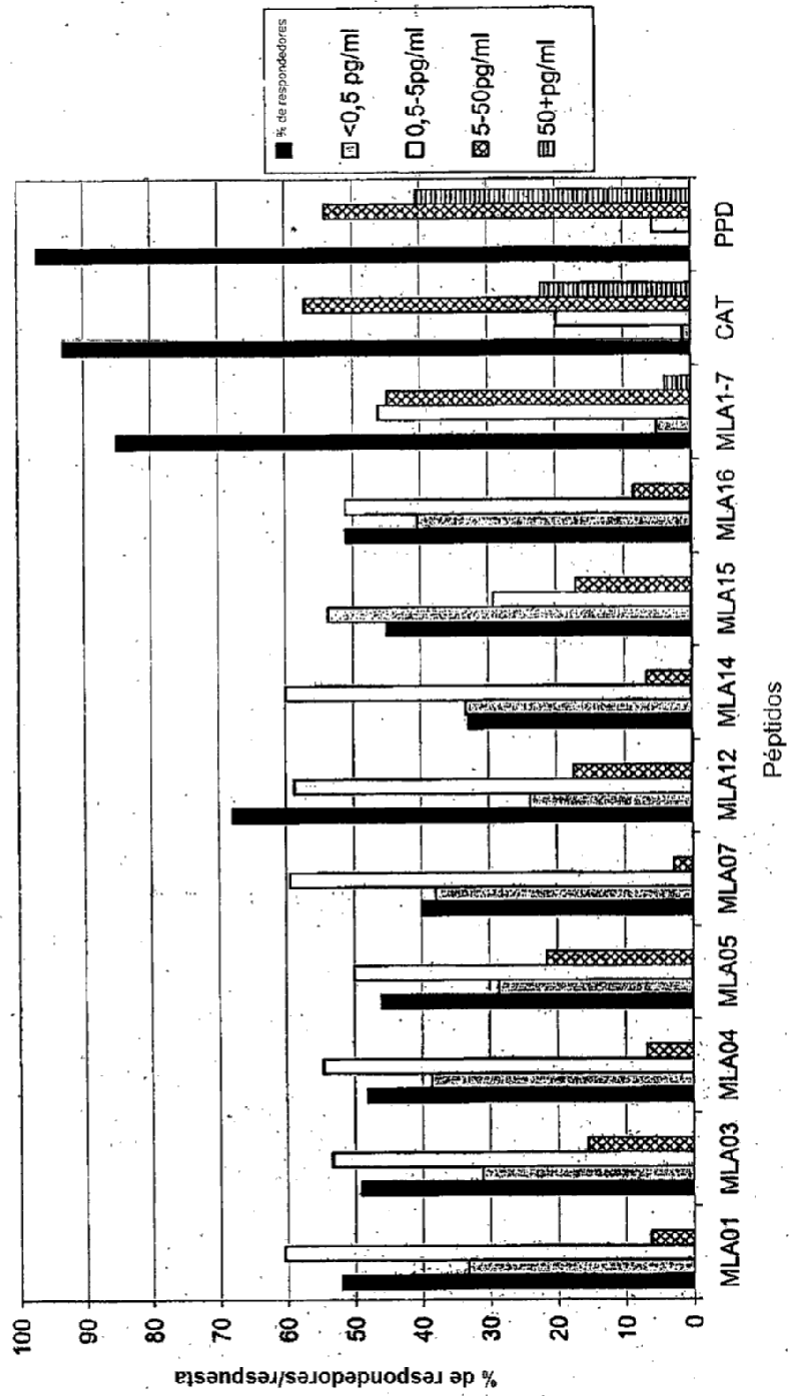


Figura 7

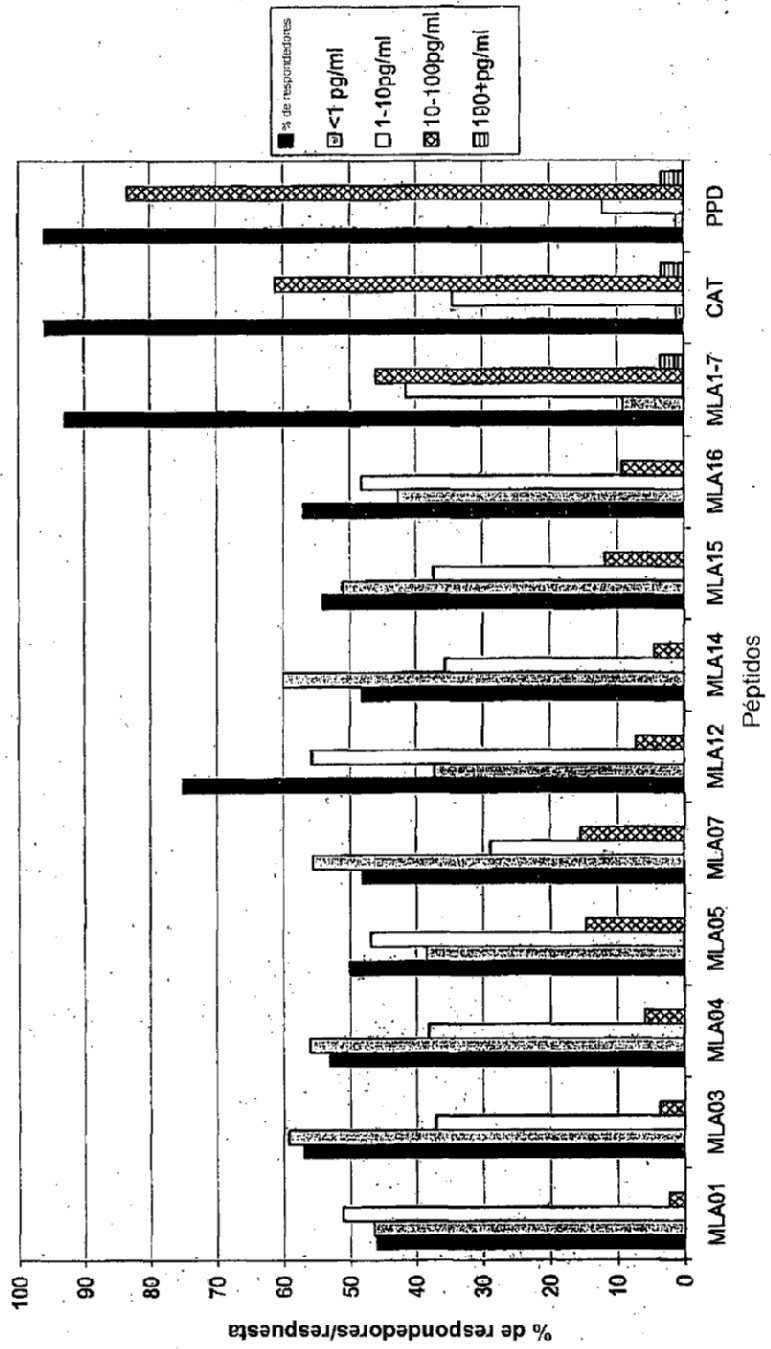


Figura 8

