

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 407**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

**A61K 39/35** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2009 E 09706855 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2244734**

54 Título: **Un método para inducir tolerancia a un alérgeno**

30 Prioridad:

**01.02.2008 AU 2008900463**

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

**05.10.2016**

73 Titular/es:

**MURDOCH CHILDRENS RESEARCH INSTITUTE  
(100.0%)  
Royal Children's Hospital Flemington Road  
Parkville, VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**TANG, MIMI LAI-KUAN**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 585 407 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

Un método para inducir tolerancia a un alérgeno

5 Datos de presentación

Esta solicitud se asocia con y reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional Australiana No. 2008900463, presentada el 1 de febrero de 2008.

10 Campo

La presente invención en general se relaciona con el campo de alergias. Más particularmente, la presente invención proporciona un probiótico y un alérgeno de alimento para uso en tratar una alergia en un sujeto al inducir tolerancia a un alérgeno asociado con la alergia. También se describen aquí kits medicinales útiles en protocolos para inducir tolerancia o reducir intolerancia en un sujeto.

15

Antecedentes

20 Los detalles bibliográficos de las publicaciones mencionadas por el autor en esta especificación se recolectan alfabéticamente al final de la descripción.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta especificación no es, y no se debe interpretar como un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

25

Han aumentado exponencialmente las tasas de enfermedades alérgicas desde 1980. Mientras que se podría estar estabilizando la prevalencia de asma, eccema y, siguen aumentando la alergia por alimentos y anafilaxis (Gupta et al, Thorax 62 (1): 91-96, 2007; Robertson et al, Med J Aust 180 (6): 273-276, 2004). En el Reino Unido, han incrementado los ingresos hospitalarios por alergia a alimentos y anafilaxis en un 500% y 700%, respectivamente, desde 1991 hasta 2005 (Gupta et al, supra 2007). La prevalencia de la alergia al maní infantil se ha duplicado entre 1997 y 2002 (Sicherer et al, J Allergy Clin Immunol 112 (6): 1203-1207, 2003). Los datos del Instituto Australiano de Salud y Bienestar muestran tendencias similares (Mullins, Med J Aust 186 (12): 618-621, 2007). Los trastornos alérgicos son ahora las enfermedades crónicas más comunes que afectan a los niños en las sociedades occidentales. Se estima que el 5% y el 8% de los niños tienen una alergia a alimentos (Bock, Pediatrics 79 (5): 683-688, 1987; Young et al, Lancet 343 (8906): 1127-1130, 1994), y el 1.5% de los niños tienen alergia al maní (Grundy et al, J Allergy Clin Immunol 110 (5): 784-789, 2002).

30

35

Los alimentos son los desencadenantes más comunes de las reacciones alérgicas graves (anafilaxis) [Kemp et al, Arch Intern Med 155 (16): 1749-1754, 1995]. La alergia al maní es de particular interés ya que las reacciones al maní son generalmente severas, involucran de dos o más sistemas de órganos en el 41% de los sujetos alérgicos al maní, e involucran el sistema respiratorio (anafilaxis) en el 42% de los sujetos alérgicos al maní (Sicherer et al, Pediatrics 102(1):199-205, 1998). Las reacciones al maní provocaron del 27% (Pumphrey, Curr Opin Allergy Clin Immunol 4(4):285-290, 2004) al 30% (Bock et al, J Allergy Clin Immunol 107 (1): 191-193, 2001) de muertes por anafilaxis inducida por alimentos. La dosis umbral para reacción al maní es a menudo baja – se pueden inducir síntomas subjetivos y objetivos por tan poco como 100 µg (<1/1000 de un maní) y 2 mg de proteína de maní (<1/100 de un maní), respectivamente (Hourihane et al, J Allergy Clin Immunol 100 (5): 596-600, 1997). En estudios de maní controlados con placebo, doble ciego, 50% de los sujetos alérgicos al maní reaccionaron a 3 mg de proteína de maní (1/100 de un maní) [Wensing et al, J Allergy Clin Immunol 110 (6): 915-920, 2002]. Adicionalmente, los sujetos con reacciones severas a maní tienden a reaccionar a dosis más bajas de maní que aquellos con síntomas leves (Wensing et al, supra 2002). Por lo tanto, las reacciones más alérgicas al maní son graves, se pueden producir reacciones a bajas dosis de alérgeno, y las reacciones inducidas por maní representan una gran proporción de muertes por alergia a alimentos.

40

45

50

La mayoría de los casos de primera alergia al maní se presentan en la primera infancia entre las edades de 14 y 24 meses (Sicherer et al, supra, 1998). A diferencia de la alergia a la leche y al huevo que en general se resuelve a finales de la infancia, la alergia al maní suele persistir. Sólo del 18% (Hourihane et al BMJ 316 (7140): 1271-1275, 1998) al 21% (Skolnick et al, J Allergy Clin Immunol 107 (2): 367-374, 2001), de los niños superan las alergias al maní (desarrollo espontáneo de tolerancia), y no hay predictores fiables para resolución (Skolnick et al, supra 2001; Hourihane et al, supra 1998). Las ingestas accidentales de maní en niños con alergia al maní son comunes - 50% dentro de 1 año y el 75% dentro de los 5 años (Bock y Atkins, J Allergy Clin Immunol 83 (5): 900-904, 1989). La mayoría de las reacciones de ingesta accidental son amenaza para la vida (Vander Leek et al, J Pediatr 137 (6): 749-755, 2000). Sólo el 25% de los pacientes alérgicos al maní eran capaces de lograr la evitación completa sin reacción en un periodo de cinco años (Bock y Atkins, supra, 1989). Por lo tanto, los pacientes con alergia al maní se mantienen en significativo riesgo constante de reacciones graves.

55

60

65

No ha habido ningún tratamiento efectivo a largo plazo para la alergia a alimentos. El manejo implica evitar el alimento en cuestión, reconocimiento temprano de los síntomas de una reacción alérgica e inicio del tratamiento de emergencia

apropiado de las reacciones alérgicas, particularmente anafilaxis. La adrenalina es la terapia de primera línea para la anafilaxia y está disponible como un dispositivo autoinyectable, el EpiPen (Registrado)/EpiPen Jr (registrado) en Australia (y otros dispositivos en los EE.UU.). El EpiPen (registrado) o EpiPen Jr (registrado) se deben sustituir con regularidad (12-18 meses) y requiere una formación específica en su uso (Mehr et al, *Pediatr Allergy Immunol* 18 (5): 448-452, 2006). Como la mayoría de las reacciones al maní son graves, la mayoría de los niños con alergia al maní se prescriben con EpiPen (registrado), que deben llevar con ellos en todo momento. El EpiPen (registrado) se debe administrar si la exposición accidental resulta en una reacción grave que implican los sistemas respiratorios o cardiovasculares (anafilaxis). Sin embargo, la mayoría de los pacientes que se han prescrito con un EpiPen (registrado) dejan de usarlo en el momento de una reacción alérgica grave. Sólo el 71% de los pacientes con prescripción de un EpiPen tenían su EpiPen con ellos, el 10% de éstos habían expirado, y sólo el 32% fueron capaces de demostrar su uso correcto (Sicherer et al, *Pediatrics* 105(2):359-362, 2000). La carga de vivir con alergia al maní y su manejo es importante – los padres reportan que los niños con alergia al maní tienen una peor calidad de vida que los niños con enfermedades reumatológicas (Primeau et al, *Clin Exp Allergy* 30 (8): 1135-43, 2000). Por lo tanto, por la alergia al maní, el alto riesgo de reacciones potencialmente mortales graves repetidas y la limitada fiabilidad de EpiPen (registrado) que se utilizan para el tratamiento de las reacciones agudas en la comunidad resaltan la necesidad de opciones de tratamiento a largo plazo que puedan lograr la modulación inmunitaria y tolerancia.

Son poco conocidos los mecanismos que conducen al desarrollo de la alergia a alimentos. Se considera que la alergia a alimentos es provocada por un fallo de la tolerancia oral. La tolerancia oral se puede inducir por ya sea una única exposición a alta dosis de antígeno o por exposiciones repetidas de baja dosis de antígeno. La tolerancia a altas dosis implica la apoptosis o anergia mediada por Fas, mientras que la tolerancia a bajas dosis es mediada por las células T reguladoras (Treg). Estudios recientes sugieren que la anergia e inducción de Treg pueden no ser mecanismos distintos para la tolerancia, y la mayoría de los estudios ahora se centran en la función de Treg (revisado en [Strobel and Mowat, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6 (3): 207-213, 2006]). Se han identificado diversos subgrupos de Treg que incluyen células Th3, células Tr1, y CD4+CD25+Treg. Las células Th3 producen TGF $\beta$  y cantidades variables de IL-4 e IL-10 (Chen et al, *Science* 265 (5176): 1237-1240, 1994). Las células Tr1 secretan IL-10 (Groux et al, *Nature* 389 (6652): 737-742, 1997). El CD4+CD25+Treg expresa el factor forkhead box P3 de transcripción (FOXP3) y median sus efectos supresores en parte por la superficie celular unida a TGF $\beta$  y en menor medida a IL-10 (Chung et al, *J Leukoc Biol* 77 (6): 906-913, 2005). CD4+CD25+Treg surge predominantemente en el timo, pero también se puede desarrollar en los ganglios linfáticos mesentéricos, las placas de Peyer y ganglios linfáticos periféricos en los que cumple una función en la tolerancia de la mucosa (Chung et al, *supra* 2005). Se ha demostrado que la Treg y las citoquinas reguladoras TGF $\beta$  e IL-10 desempeñan una función importante en la inducción de la tolerancia oral y en la alergia a alimentos. En un modelo de alergia a los alimentos de ratón, los ratones tolerantes a  $\beta$ -lactoglobulina tienen mayores cantidades de células que secretan IgA específicas a antígeno en las placas de Peyer y mayores niveles de IgA fecal, así como aumento en la producción de TGF $\beta$  e IL-10 por las células T de placa de Peyer en comparación con ratones sensibilizados (Frossard et al, *J Allergy Clin Immunol* 114 (2): 377-382, 2004).

La evidencia de una función para Treg en la inducción de tolerancia y alergia a los alimentos también se observa en estudios en humanos. Los niños con alergia a alimentos tienen pocos linfocitos TGF $\beta$  en el epitelio y la lámina propia del duodeno (Perez-Machado et al, *Eur J Immunol* 33 (8): 2307-2315, 2003), y muestran expresión reducida de TGF mediante los linfocitos del duodeno específicos de la leche (Beyer et al, *J Allergy Clin Immunol* 109 (4): 7070-713, 2002). Se han reportado hallazgos similares en pacientes con alergias a alimentos mediadas por no-IgE (enterocolitis inducida por proteínas de alimento) [Chung et al, *J Allergy Clin Immunol* 109 (1): 150-154, 2002]. En sujetos con alergia a la leche de vaca, la resolución de la alergia se asocia con un aumento del número de células T CD4+CD25+ y proliferación inducida por  $\beta$ -lactoglobulina reducida en comparación con aquellos con alergia en curso (Karlsson et al, *J Exp Med* 199 (12): 1679-88, 2004). El agotamiento in vitro de estas células CD4+CD25+ lleva a aumento de la proliferación inducida por la  $\beta$ -lactoglobulina lo que sugiere que la inducción de la tolerancia oral se relaciona con un aumento de las células Treg CD4+CD25+ (Karlsson et al, *supra* 2004). La tolerancia oral también se asocia con un aumento de IFN $\gamma$  (Tureanu et al, *J Clin Invest* 111 (7): 1065-1072, 2003). La comparación de respuestas inmunitarias específicas al maní en niños normales y niños con alergia al maní, y niños alérgicos al maní que habían superado su alergia mostró respuestas sesgadas al Th2 en alergia al maní y respuestas sesgadas al Th1 en tolerancia oral (niños normales y niños que superaron su alergia al maní) [Tureanu et al, *supra* 2003]. Estos hallazgos sugieren que la alergia a alimentos se asocia con la pérdida de la tolerancia, Treg y TGF $\beta$  reducida, así como respuestas Th1 reducidas y aumento de respuestas Th2.

La inmunoterapia se utiliza para el tratamiento a largo plazo de asma, rinitis alérgica y anafilaxia por veneno de insectos. Se ha mostrado que la inmunoterapia subcutánea (SCIT) reduce los síntomas clínicos e induce tolerancia prolongada a alérgenos mediante la modulación de respuestas inmunitarias (Norman, *J Allergy Clin Immunol* 113 (6): 1013-1023, 2004; Schmidt-Weber and Blaser, *Spinger Semin Immunopathol* 25 (3-4): 377-390, 2004). Los estudios sobre mecanismos han mostrado que la SCIT induce Treg y restaura el equilibrio perturbado de células efectoras Th1/Th2 en pacientes alérgicos. La SCIT conduce a la reducción de IgE específico a alérgeno, IgG4 específico a alérgeno elevado, expresión de citoquina Th2 reducida (IL-4, IL-5), y en la mayoría de los estudios el aumento de la expresión de citoquinas Th1 (IFN $\gamma$ ) [Norman, *supra* 2004; Schmidt-Weber and Blaser, *supra* 2004]. Se han mostrado que estos efectos son mediados por el aumento del número de CD4+CD25+Treg, y la inducción de CD4+CD25+Treg específica a antígeno con actividad supresora que está mediada por la producción de IL-10 y/o TGF $\beta$  (Norman, *supra* 2004; Schmidt Weber and Blaser, *supra* 2004). Otros efectos inmunológicos de SCIT incluyen la apoptosis de células Th2 específicas a

alérgeno, reducción de números de mastocitos del tejido y reducción de los niveles séricos de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Norman, supra 2004). También se ha mostrado que la inmunoterapia sublingual (SLIT) es efectiva en la reducción de los síntomas clínicos en la alergia respiratoria (asma, rinitis), sin embargo, los efectos inmunológicos no están tan bien caracterizados. El aumento de IgG4 específico y reducción de IgE específico se han reportado en algunos pero no todos los estudios (Norman, supra, 2004). La inmunoterapia oral (OIT) no ha sido consistentemente efectiva cuando se utiliza para el tratamiento de la alergia respiratoria y fue abandonado en gran medida por el tratamiento de estas afecciones.

Se han intentado diversos métodos de inmunoterapia para el tratamiento de alergia a alimentos. Se mostró el tratamiento con un anticuerpo anti-IgE humanizado aumenta la dosis umbral necesaria para inducir una reacción, sin embargo, este método es caro y sólo proporciona un beneficio a corto plazo sin necesidad de modificar la historia natural de la enfermedad (Leung et al, *N Engl J Med* 348 (11): 986-993, 2003). La SCIT para anafilaxis de maní fue efectiva al inducir la desensibilización y aumentar la dosis umbral necesaria para inducir una reacción (de 178 mg a 2805 mg, o desde la mitad de un maní a nueve manís) en sujetos que fueron capaces de continuar en la terapia de mantenimiento (Nelson et al, *J Allergy Clin Immunol* 99 (6 Pt1): 744-751, 1997). Sin embargo, las reacciones sistémicas graves fueron frecuentes (39% durante el mantenimiento) y se ha abandonado este método. Se está investigando la SCIT de péptido mutada y proteína para evitar reacciones sistémicas, sin embargo, ha sido lenta la traducción al ámbito clínico. La SLIT se ha utilizado para el tratamiento de la alergia a alimentos. Un estudio controlado placebo doble ciego de SLIT con extracto de avellana durante cuatro meses en 41 adultos con alergia a la avellana resultó en un aumento del umbral para la reacción en el grupo de tratamiento activo (de 2.29 g a 11.56 g), pero no en el grupo placebo (3.49 g a 4.14 gramo). 50% del grupo de tratamiento en comparación con el 9% del grupo placebo fueron capaces de tolerar 20 g de avellanas durante exposición oral al cabo de 8-12 semanas después de que se había interrumpido la inmunoterapia, lo que indica tolerancia de larga duración. Como una evidencia adicional de la tolerancia inmunitaria, el grupo de tratamiento activo demostró aumento de los niveles de IL-10 en suero e IgG específico a avellana. La SLIT con pulpa de kiwi fresca también resultó en tolerancia clínica prolongada al kiwi en una mujer de 29 años que demostró efectos protectores de la SLIT incluso después de que se había suspendido por un período de cuatro meses (Kerzl et al, *J Allergy Clin Immunol* 119 (2): 507-508, 2007). Estos resultados confirman el potencial de SLIT como tratamiento para la alergia a los alimentos en adultos con evidencia de efectos inmunomoduladores y protección clínica prolongada.

Sin embargo, una desventaja importante de la ITSL que limita su aplicabilidad en los niños es la necesidad de mantener el extracto bajo la lengua durante un período de tiempo (1-3 minutos) antes de ingerirlo o descargarlo (Enrique et al, *J Allergy Clin Immunol* 116 (5): 1073-1079, 2005; Kerzl et al, supra 2007). La OIT ofrece la ventaja de una aceptación y cumplimiento mejorado en los niños (Buchanan et al, *J Allergy Clin Immunol* 119 (1): 199-205, 2007).

Se ha utilizado OIT con éxito para el tratamiento de la alergia a alimentos. Los informes de casos describen la desensibilización con la OIT en la alergia a leche (Nucera et al, *Dig Dis Sci* 45 (3): 637-641, 2000; Bauer et al, *alérgicos* 54 (8): 894-895, 1999). Una niña de 12 años fue desensibilizada a la leche de vaca y se mantuvo en la OIT indefinidamente (Bauer et al, supra, 1999). Una niña de seis años con alergia a leche de vaca fue desensibilizada a la leche después de cuatro meses de la OIT de leche, y experimentó cambios inmunológicos dramáticos, incluyendo la pérdida completa de la reacción SPT a la leche de vaca, reducción de los niveles de IgE específicos a leche en suero, aumento de los niveles de IgG4 e IgA específicos de la leche en suero, así como el aumento de IFN $\gamma$  y disminución de la producción de IL-4 en cultivos de PBMC estimulados con  $\beta$ -lactoglobulina (Nucera et al, supra 2000). Esto sugiere que la OIT puede inducir tolerancia en algunas circunstancias. Un amplio estudio de controles de casos de OIT en 51 pacientes con edades entre 3 - 55 años con diversas alergias a alimentos mostró desensibilización exitosa en el 83% (45/54) de los sujetos que se quedaron con OIT diaria (Patriarca et al, *Aliment Pharmacol Ther* 17 (3): 459-465, 2003). Se demostró que una reducción de IgE específica a maní y el aumento de IgG4 específica maní sugiere la posibilidad de inducción de la tolerancia, pero esto no se examinó específicamente (Patriarca et al, supra 2003). Un RCT doble ciego de la OIT leche (dosis de mantenimiento de 200 ml) durante seis meses en 21 niños con alergia a la leche reportó desensibilización exitosa a la leche en el 71% (15/21) [200 ml de leche a diario tolerada], y la desensibilización parcial en 3/21 (14%) [40-80 ml de leche tolerada] (Meglio et al, *Allergy* 59(9):980-987, 2004). Ninguno de los niños demostró una reducción en IgE específico a leche lo que sugiere que no se logró que esa tolerancia. En todos estos estudios previos, no es seguro que la OIT sea efectiva en inducir tolerancia a las exposiciones a alimentos DBPC no se realizaron después de que se suspendió la inmunoterapia. Rolinck-Werninghaus reportó dos pacientes en los que la interrupción OIT para leche o huevo luego de 37 semanas y 41 semanas de OIT respectivamente resultó en la pérdida de desensibilización, lo que indica que no se había logrado tolerancia (Rolinck-Werninghaus et al, *alérgicos* 60 (10): 1320 -1322, 2005).

Los estudios e investigaciones dirigidas a desarrollar protocolos para manejar enfermedades alérgicas se han centrado en la prevención en lugar de tratamiento y se han basado en modelos animales, que replican pobremente la condición de enfermedad alérgica humana (por ejemplo: Schabussora and Widermann, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8(6):557-564, 2008; Daniel et al, *Allergy* 52(11):1237-1242, 2007; and Shida et al, *Clin Exp Allergy* 32:563-570, 2002). Ni un protocolo de prevención ni protocolo de tratamiento a base de solo probióticos o prebióticos ha logrado un éxito a gran escala. Los estudios iniciales de los probióticos o prebióticos para la prevención del eczema han proporcionado resultados prometedores (Osborne and Sinn, *Probiotics is infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity* (Revisión), *Cochrane Database Syst Rev Art No. CD006475*, 2007; Osborne and Sinn, *Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity* (Revisión), *Cochrane Database Syst Rev Art No. CD006474*, 2007). Sin embargo, los probióticos para el tratamiento del eczema no han tenido éxito al igual que el uso de

solo probióticos o prebióticos para la prevención o tratamiento de la alergia a alimentos (Boyle et al, Syst Rev 8 de octubre de 2008 Número 4, CD006135). Pan et al. J Allerg Clin Immunol 117: S327, 2006 compara la capacidad de dos composiciones para inducir tolerancia inmunológica al maní: uno que contiene un suplemento alimenticio probiótico (ImmuSoy) y el segundo es un LGG (Lactobacillus rhamnosus GG). La capacidad de Lactobacillus para manejar la alergia a la leche de vaca, se divulga en Majamaa et al. J Allerg Clin Immunol, 99 (2): 179-185, 1997. En los experimentos publicados se utilizó LGG en combinación con eliminación de alérgenos. El documento US 7060687 B2 utiliza Lactobacillus transformados o bacterias Streptococcus para inducir tolerancia inmunológica a alérgenos suspendidos en el aire.

Son obligatorias nuevas estrategias para tratar alergias que potencien la inducción de tolerancia.

#### Resumen

La presente invención contempla el uso de inmunoterapia con alérgenos (en particular un alérgeno de alimento) y agentes probióticos para inducir tolerancia en sujetos, tales como humanos y animales no humanos, al alérgeno. La "Inmunoterapia contra alérgeno" incluye la administración del alérgeno o un componente antigénico o forma modificada del mismo mediante cualesquier medios tales como medio oral, subcutáneo, sublingual, inhalación, intravenoso, rectal o intraperitoneal.

El agente probiótico que se va a utilizar en la invención es un agente probiótico seleccionado de la lista que consiste de una especie de Lactobacillus, Bifidobacterium, Escherichia, Bacillus, Saccharomyces y/o Streptococcus. En una realización, el agente probiótico es Lactobacillus rhamnosus.

La inmunoterapia con alérgenos y agente probiótico(s) se puede administrar de forma secuencial o dar de forma simultánea. La referencia a "administración" incluye administración secuencial o simultánea del alérgeno y probiótico.

El alérgeno incluye inter alia cualesquier alérgenos de alimento. Particularmente se contemplan aquí las alergias a alimentos tales como a leche, huevos, leguminosas (por ejemplo maní), frutos secos, pescado, mariscos, soja y trigo y pan.

Por lo tanto, utilizar protocolos para inducir tolerancia a alérgeno o reducir intolerancia en un sujeto en necesidad de esta forma parte de la presente invención. El término "inducir tolerancia" incluye reducir la sensibilidad a un alérgeno y reducir la sensibilidad a una alergia. En particular, la presente invención se dirige a reducir la intolerancia a un alérgeno de alimento mediante la administración secuencial o simultáneamente de un alérgeno de alimento y un probiótico a un sujeto en necesidad de tratamiento.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un probiótico y un alérgeno de alimento para uso en a) tratar intolerancia a dicho alérgeno en un sujeto en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se administran secuencial o simultáneamente a dicho sujeto; b) tratar una alergia inducida por el alérgeno en un sujeto al inducir tolerancia a dicho alérgeno, en donde dicho probiótico se va a utilizar en combinación con dicho alérgeno de alimento; o c) inducir tolerancia a dicho alérgeno en un sujeto en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto; en donde el probiótico en (a), (b) y (c) se selecciona de la lista que consiste de una especie de Lactobacillus, Bifidobacterium, Escherichia, Saccharomyces, Streptococcus y Bacillus.

La presente invención también proporciona el uso de un probiótico y un alérgeno de alimento en la fabricación de un medicamento para a) tratar intolerancia a dicho alérgeno en un sujeto en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se administran secuencial o simultáneamente a dicho sujeto; b) tratar una alergia inducida por el alérgeno en un sujeto al inducir tolerancia a dicho alérgeno, en donde dicho probiótico se va a utilizar en combinación con dicho alérgeno de alimento; o c) inducir tolerancia a dicho alérgeno en un sujeto en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto; en donde el probiótico en (a), (b) y (c) se selecciona de la lista que consiste de una especie de Lactobacillus, Bifidobacterium, Escherichia, Saccharomyces, Streptococcus y Bacillus.

Si bien no se pretende limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, se propone el efecto combinado del agente probiótico con la inmunoterapia contra alérgeno para aumentar las respuestas Th1 en comparación con las respuestas Th2.

Por "sujeto" se entiende un animal humano o no humano, tal como un animal de compañía, animales de granja o animal salvaje capturado. El sujeto generalmente está en necesidad de tratamiento.

#### Descripción detallada

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado o número entero o grupo de elementos o enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

Como se utiliza en la especificación objeto, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a “un agente biótico” incluye un agente biótico individual, así como dos o más agentes bióticos (que incluye dos o más probióticos o prebióticos o un probiótico y un prebiótico); la referencia a “un alérgeno” incluye un solo alérgeno, así como dos o más alérgenos; la referencia a “la invención” incluye aspectos individuales y múltiples de una invención; y así sucesivamente.

La presente solicitud divulga un protocolo medicinal para tratar un sujeto con una alergia al generar tolerancia en el sujeto a un alérgeno. El protocolo comprende proporcionar al sujeto un agente biótico y el alérgeno o una forma modificada del mismo para el cual se desea tolerancia. En particular la presente solicitud proporciona un probiótico y un alérgeno de alimento para uso en tratar una alergia inducida por el alérgeno en un sujeto al inducir tolerancia a dicho alérgeno, en donde dicho probiótico se va a utilizar en combinación con dicho alérgeno de alimento, en donde el probiótico se selecciona de la lista que consiste de una especie de Lactobacillus, Bifidobacterium, Escherichia, Saccharomyces, Streptococcus y Bacillus.

“Inducir tolerancia” incluye reducir la sensibilidad a un alérgeno o un alérgeno asociado con una alergia. Por lo tanto, abarca reducir la sensibilidad a una alergia así como también reducir intolerancia a un alérgeno - alergia inducida.

Por lo tanto, la presente solicitud divulga un método para tratar intolerancia a alérgeno en un sujeto, el método comprende administrar secuencial o simultáneamente al sujeto un agente biótico y el alérgeno o un componente antigénico o fragmento o análogo del mismo en una cantidad efectiva para inducir tolerancia al alérgeno. En particular la presente invención proporciona un probiótico y un alérgeno de alimento para uso en tratar intolerancia a dicho alérgeno en un sujeto en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto, en donde el probiótico se selecciona de la lista que consiste de una especie de Lactobacillus, Bifidobacterium, Escherichia, Saccharomyces, Streptococcus y Bacillus.

Se proporciona el alérgeno para iniciar y/o reforzar y/o mantener una respuesta inmunitaria. La referencia a un “alérgeno” incluye cualquier sustancia que sea capaz de estimular una reacción de hipersensibilidad típica en sujetos atópicos. Los alérgenos contemplados en este documento incluyen cualquier sustancia en alimentos, fármacos, perfumes, plantas, entorno o sistemas biológicos (por ejemplo, virus o células procariotas o eucariotas), así como alérgenos químicos. Los tipos de alérgenos incluyen productos de animales (por ejemplo, piel y caspa de gatos, cálices de cucarachas, excreción de ácaros del polvo); fármacos (por ejemplo, penicilina, sulfonamidas, salicilatos (que también se encuentran naturalmente en numerosas frutas), anestésicos locales); alimentos (por ejemplo, apio, apio nabo, maíz o mazorca, huevos (normalmente la albúmina, la clara), fruta, calabaza, leguminosas (por ejemplo, frijoles, guisantes, maní, soja), leche, mariscos, sésamo, soja, frutos secos (por ejemplo, nueces almendras), trigo, picaduras de insectos (por ejemplo, picadura venenosa de abeja, picadura venenosa de avispa, picaduras de mosquitos); esporas de moho, látex, metal; pólenes vegetales (por ejemplo, hierba - raigrás, hierba Timothy, malezas - ambrosía, plantago, ortiga, Artemisia, vulgaris, Chenopodium album, acedera, árboles - aliso abedul, avellano, carpe, Aesculus, sauce, álamo, Platanus, tilo, olea).

La presente invención se dirige a alérgenos de alimentos tales como los encontrados en leche, huevos, maní, frutos secos, pescado, mariscos, soja y trigo.

En una realización, la presente invención se dirige a inducir tolerancia a alérgenos de leguminosas y en particular alérgenos de maní.

La referencia a “alérgeno” incluye el alérgeno en una forma purificada o sustancialmente purificado o aislada o cuando se incorporan como parte de una sustancia tal como alimento, sistema biológico, o composición química. Adicionalmente, el alérgeno que se va a administrar también puede ser una forma modificada que incluye un derivado o componente antigénico u homólogo o análogo químico. Un “alérgeno” abarca una mezcla de alérgenos, así como alérgenos modificados genéticamente o modificados químicamente.

La presente invención se dirige a inducir tolerancia o reducir la sensibilidad a un alérgeno de alimento o una alergia asociada con el alérgeno de alimento así como también reducir intolerancia a un alérgeno de alimento - alergia inducida.

El término “biótico” abarca tanto un probiótico como un prebiótico. Un probiótico es generalmente un organismo eucariótico o procariótico vivo que tiene una propiedad beneficiosa cuando se proporciona a un sujeto. En un aspecto, el probiótico complementa las microflora existente en el sujeto. Por lo tanto, el agente probiótico es un microorganismo vivo que puede conferir un beneficio para la salud a un sujeto anfitrión. El agente probiótico puede ser un cultivo de microorganismos o proporcionar en un suplemento dietético o se puede secar por congelamiento y reconstituir antes de uso. Un prebiótico es un agente que facilita o confiere propiedades de crecimiento, mantenimiento y/o beneficiosas de o sobre la microflora del sujeto. Un prebiótico incluye un oligosacárido y material de fibra soluble o insoluble. Un probiótico y un prebiótico también se pueden administrar secuencial o simultáneamente. En la presente invención se utilizan los probióticos.

Ejemplos de agentes probióticos incluyen especies de Lactobacillus, Escherichia, Bacillus, Bifidobacterium, Saccharomyces y Streptococcus.

Los agentes probióticos particularmente útiles son del género *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* immunitass, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus helveticus*.

Aquí se considera que el *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) es un agente probiótico particularmente útil.

Los microorganismos pueden ser de origen natural, atenuado o modificado genéticamente para introducir nuevos rasgos o alterar rasgos existentes. En una realización, el probiótico se ha modificado genéticamente para introducir un gen de alérgeno o una parte o fragmento o porción del mismo que se expresa para producir microorganismos recombinantes que liberan o exponen el sistema inmunitario del sujeto al alérgeno o un fragmento antigénico del mismo. Por lo tanto, el probiótico y alérgeno se puede administrar al sujeto como una sola entidad. Como se indicó anteriormente, un probiótico y un prebiótico también se puede administrar, junto con el alérgeno o el alérgeno puede ser producido por el probiótico.

La presente solicitud divulga un método para inducir tolerancia en un sujeto a un alérgeno, el método comprende administrar al sujeto una cantidad de alérgeno o fragmento antigénico, componente o análogo del mismo y un agente biótico efectivo para inducir tolerancia en el sujeto al alérgeno.

En particular, la presente invención proporciona un probiótico y un alérgeno de alimento para uso en inducir tolerancia en un sujeto a dicho alérgeno, en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto, en donde el probiótico se selecciona de la lista que consiste de una especie de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Saccharomyces*, *Streptococcus* y *Bacillus*.

En una realización particular, el alérgeno de alimento es una leguminosa tal como un maní.

Se puede administrar uno o más alérgenos en general en una cantidad que no provoca ansiedad al sujeto, tal como en forma de anafilaxia. Como se indicó anteriormente, el alérgeno de leguminosa se puede producir también mediante una forma probiótica del biótico.

En una realización particular, el probiótico es una especie de *Lactobacillus*, preferiblemente *L. rhamnosus*.

Por lo tanto otro aspecto de la presente invención, es un probiótico y un alérgeno de alimento para uso en inducir tolerancia en un sujeto a un alérgeno de leguminosas, en donde dicho probiótico y alérgeno de leguminosas se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto. El agente probiótico se selecciona de la lista que consiste de *L. acidophilus* NCFM, *L. casei*, *L. casei* Shirota, *L. casei* immunitass, *L. johnsonii*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* y *L. helveticus*.

La presente solicitud divulga adicionalmente, un método para inducir tolerancia en un sujeto a un alérgeno de leguminosas, el método comprende administrar al sujeto una cantidad del alérgeno de leguminosas o un fragmento antigénico, componente o análogo del mismo y un agente biótico es un agente prebiótico seleccionado de la lista que consiste de un oligosacárido y una fibra efectiva para inducir tolerancia en el sujeto al alérgeno.

El prebiótico puede ser un oligosacárido o una fibra soluble o insoluble.

La presente invención contempla adicionalmente, un probiótico y un alérgeno de alimento para uso en inducir tolerancia en un sujeto a un alérgeno de maní en donde dicho probiótico y alérgeno de maní se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto en donde el agente probiótico se selecciona de la lista que consiste de *L. acidophilus* NCFM, *L. casei*, *L. casei* Shirota, *L. casei* immunitass, *L. johnsonii*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* y *L. helveticus*.

La presente solicitud también divulga un método para inducir tolerancia en un sujeto a un alérgeno de maní, el método comprende administrar al sujeto una cantidad del alérgeno de maní o un fragmento antigénico, componente o análogo del mismo y un agente prebiótico seleccionado de la lista que consiste de un oligosacárido y una fibra efectiva para inducir tolerancia en el sujeto al alérgeno.

Como se indicó anteriormente, la fibra puede ser soluble o insoluble.

También se describe un método para reducir una sensibilidad del sujeto a una alergia, el método comprende administrar al sujeto un agente biótico en conjunto con un alérgeno asociado con la alergia o un fragmento antigénico o componente o análogo del alérgeno durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para un nivel de tolerancia que se va a inducir en el sujeto.

La "administración" incluye administración secuencial y simultánea de un probiótico y/o prebiótico y alérgeno.

Si bien no se pretende limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, se propone el efecto combinado del agente biótico con la inmunoterapia con alérgenos para aumentar las respuestas Th1 en comparación con las respuestas Th2.

5 La presente solicitud también divulga un kit medicinal que comprende en forma compartimental un primer compartimento o una serie de compartimentos que comprenden agentes bióticos y un segundo compartimento o una serie de compartimentos que comprenden un alérgeno o fuente de alérgenos o fragmentos antigénicos, componentes o análogos del mismo con las instrucciones para uso.

10 Las instrucciones para uso incluyen un protocolo medicinal para utilizar los agentes bióticos en conjunto con un alérgeno o fuente de alérgeno para inducir la tolerancia o sensibilidad reducida a un alérgeno.

15 Una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad necesaria para alcanzar por lo menos parcialmente el efecto inmunológico deseado a tolerancia o para retrasar la aparición o inhibir la progresión o detener por completo, la aparición de la progresión de una respuesta alérgica a un alérgeno en el sujeto en necesidad de tratamiento. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos de rutina. La "cantidad efectiva" se relaciona con el alérgeno y biótico, de forma individual o combinada. Convenientemente, la administración de por lo menos el alérgeno incluye una cantidad "precipitada" seguida de una cantidad de "mantenimiento". Ejemplos de cantidades afectivas oscilan entre 0.05 mg a 2000 mg por día, semana o mes. Para los alérgenos de maní, es efectivo 0.1 mg a 300 mg por día.

Los usos de la presente invención pueden tener utilidad en el tratamiento de un sujeto en necesidad del mismo en lugar de profilaxis. Dicho esto, se contempla un componente profiláctico.

25 Como se utiliza aquí, los términos "tratar" o "tratamiento" abarca la administración de un agente que induce tolerancia a un alérgeno.

La presente solicitud divulga adicionalmente un método para inducir un nivel de tolerancia a una alergia en un sujeto, el método comprende proporcionar al sujeto cantidades efectivas de un biótico y un alérgeno asociado con la alergia.

30 Como se indicó anteriormente, se puede proporcionar un único alérgeno o se proporcionan múltiples alérgenos.

El "nivel" de tolerancia incluye la tolerancia completa o un aumento del umbral de la cantidad de alérgeno al cual se puede exponer un sujeto antes de la inducción de una reacción alérgica adversa.

35 El término "sujeto" como se utiliza aquí, se refiere a un animal, particularmente un mamífero y más particularmente un primate que incluye un primate inferior y aún más particularmente, a un humano que se puede beneficiar de los usos de la presente invención y los métodos descritos aquí. En general, el sujeto está en necesidad de tratamiento que la presente divulgación se dirige particularmente al tratamiento de una alergia a alérgeno inducida. Las pruebas genéticas de sujetos o embriones en el útero también pueden identificar sujetos en riesgo de desarrollar una alergia. Un sujeto, independientemente de si un animal o de un embrión no humano o humano, pueden ser referidos como un individuo, sujeto, animal, paciente, anfitrión o receptor. Por lo tanto, la presente invención, tiene aplicaciones tanto para humanos como veterinarias. Para conveniencia, un "animal" incluye específicamente animales de granja como vacas, caballos, ovejas, cerdos, camélidos, cabras y burros. Con respecto a caballos, estos incluyen caballos utilizados en la industria de las carreras, así como los que se utilizan con fines recreativos o en la industria ganadera. El animal no humano puede incluir también un animal de compañía tal como un perro o un gato o un animal salvaje capturado.

45 La presente invención se extiende a cualquier sujeto que tiene una alergia o predispuesto a una reacción alérgica. Por lo tanto, el sujeto puede tener una historia familiar, rasgo genético o predisposición al desarrollo de una alergia y de acuerdo con lo anterior se pueden administrar las dosis del probiótico y alérgeno para inducir un cierto nivel de tolerancia al alérgeno.

50 El biótico y el alérgeno se dan en conjunto entre sí. En la medida en que el biótico es un probiótico, el alérgeno o una forma o fragmento modificado genéticamente del mismo, se puede producir por el microorganismo.

55 Por "en conjunto" se entiende la administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes a través de las mismas o diferentes rutas o administración secuencial por las mismas o diferentes rutas. El término "en conjunto" también incluye el uso de dos o más alérgenos en el mismo protocolo terapéutico. Por administración "secuencial" se entiende una diferencia de tiempo de segundos, minutos, horas o días entre la administración de dos tipos de moléculas. Se pueden administrar el biótico y alérgeno en cualquier orden. La forma probiótica del biótico también puede producir el alérgeno. El biótico (es decir, probiótico y/o prebiótico) se puede administrar secuencial o simultáneamente con el alérgeno.

60 Como se utiliza aquí "administrar" o "administración" o "proporcionar" un agente a un sujeto incluye el suministro a través de cualquier ruta tal como rutas oral, subcutánea, sublingual, nasal, intravenosa, anal o intra-peritoneales. El

65

biótico se puede administrar durante un período de tiempo previo antes del alérgeno o viceversa. Alternativamente, ambos agentes se pueden administrar en aproximadamente el mismo tiempo.

5 Se pueden emplear formulaciones estándar para cada uno o cualquiera de los bióticos y alérgeno. Como se indicó anteriormente, el biótico puede estar en forma seca por congelamiento que luego se reconstituye antes de uso o el biótico se puede administrar como un suplemento dietético. La formulación seca por congelamiento también puede comprender el alérgeno en una forma similar. El biótico también se puede administrar con una fuente de alérgenos tales como leche, huevos, pan, de soja y similares.

10 La presente solicitud describe adicionalmente ensayos de diagnóstico para monitorizar la tolerancia subyacente a mecanismos inmunitarios. Ejemplos de mecanismos inmunitarios incluyen la monitorización de niveles IgE, IgG4 y IgA así como los niveles de células T reguladoras (Tregs).

15 La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

#### Ejemplo 1

Efectos de los probióticos y alérgeno,  
Reclutamiento de sujeto, tratamiento y recolección de muestras

20 Once adultos sanos no atópicos se trataron con LGG  $1.8 \times 10^{10}$  CFU (Dicoflor, Dicofarm SpA, Roma) al día durante 7 días. Se recolectaron diez ml de sangre venosa antes del tratamiento y en el día 7. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de polipropileno que contienen medio de cultivo de tejido RPMI heparinizada (Invitrogen, Carlsbad, CA).

25 Reparación de muestras de sangre y cultivo celular

30 Las células mononucleares se separan por centrifugación de densidad y criopreservan para futuros análisis por tandas (Dunstan et al, J Allergy Clin Immunol 112: 1178-1184, 2003). Se incubaron dos millones de células/ml con o sin antígeno en medio libre de suero AIM-V (Invitrogen) durante 48 h, o en RPMI con 10% v/v de plasma autólogo durante 6 días en los ensayos de proliferación. Se preparó LGG muerto por calor (HKL) al incubar LGG a 75° C durante 45 minutos y se utilizó una relación de HKL a células mononucleares de 5: 1. Se utilizó OVA (Sigma, St Louis, MO) a 100 µg/ml. Se utilizaron IFN $\gamma$ -1b (Boehringer Ingelheim, Alemania) y LPS (Sigma) en 10 ng/ml. Se ensayaron todos los reactivos de cultivo de células para determinar la contaminación por endotoxinas (Cape Cod Associates, E. Falmouth, MA). El OVA requiere eliminación de la endotoxina sobre columnas B de polimixina antes de uso (Pierce, Rockford, IL).

#### Citometría de flujo

40 Los sedimentos celulares se tiñeron con anticuerpos monoclonales conjugados fluorocromo en volúmenes de 50 µl de tinte. Se utilizaron cóctel-FITC de linaje (anti-CD3, 14, 16, 19, 20, 56), proteína clorofill HLA-DR- peridina (PerCP), CD123-PE y CD11c- Alofococianina (APC) para identificar fenotipos DC como CD11c<sup>hi</sup>CD123w<sup>lo</sup> mieloides DC (MDC), CD123<sup>hi</sup>CD11c<sup>lo</sup> plasmocitoide DC (pDC) y CD11c<sup>lo</sup>CD123w<sup>lo</sup> inmaduro DC (iDC), CD3 APC, CD4-PerCP, CD25-PE-Cy7 (BD Bioscience, San José, CA), se utiliza CD25-FITC y FoxP3-PE (E-Bioscience, San Diego, CA) para identificar las poblaciones de células t CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>hi</sup>. Se utilizó CFSE como un tinte de seguimiento de célula, y metanosulfonato aminostilbamidina como un tinte de viabilidad (Molecular Probes, Eugene, OR). Se incubaron CBMC o PBMC con anticuerpos marcados con fluorocromos o controles de isotipo durante 30 minutos, y para las células de tinción intracelular posteriormente se permeabilizaron, se fijaron y se tiñeron con anticuerpo FoxP3-PE o control de isotipo (eBioscience). Los datos se adquirieron en un LSR III de 4 colores (BD Bioscience) y se analizaron con el software FACSDiva v4.1 utilizando estrategias de compuerta bien definida.

#### ELISA

55 Se determinaron concentraciones de IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-12p40 y TNF- $\alpha$  en sobrenadantes de cultivo CBMC cosechadas a 48 h por ensayo de bolas de citoquinas multiplex utilizando un analizador Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin, TX). Se utilizaron perlas anti-citoquinas y reporteros de biotina anti-citoquina emparejados de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Millipore, Billerica, MA). Los datos se analizaron con el software Luminex IS 2.3 utilizando una fórmula de regresión de cinco parámetros para calcular las concentraciones de muestra a partir de curvas estándar. Las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 se evaluaron utilizando un kit ELISA TGF- $\beta$ 1 humano comercial de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD Biosciences). Se analizaron los sobrenadantes sin diluir por duplicado con citoquina recombinante como un medio positivo y de cultivo como un control negativo. Las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 se determinaron sobre la base de una curva estándar generada utilizando el programa v1.40.3 KCjunior (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) con una ecuación de cuatro parámetros. Se analizaron los datos de ELISA tanto como los datos dicotómicos contra no detectados; y como datos continuos - nivel medio en cada grupo.

65 PCR en tiempo real

El ARN se extrajo utilizando el kit RNAeasy Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) y se hace transcripción inversa en ADNc utilizando cebadores de Sistema de Síntesis de Primera Hebra Superscript y oligo (dT) (Invitrogen). Todas las reacciones incluyeron un control 'RT menos' sin transcriptasa inversa para controlar la posibilidad de contaminación de ADN. Se cuantifican FoxP3 e IL-4 mRNA por PCR en tiempo real utilizando Ensayos de Expresión de Gen TaqMan marcados con FAM en un sistema ABI Prism 7300HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). El factor alfa 1 de alargamiento de la traducción eucariótica (EEF1A1) que se expresa de forma estable en cultivos de células mononucleares humanas se utilizó como gen de referencia (Hamalaninen et al, Anal Biochem 299: 63-70, 2001). El nivel medio de expresión de genes en muestras de cADN se expresó como una relación en el sentido de expresión EEF1A1.

Estadística

Se diseñó el ensayo clínico con un tamaño de muestra de 250 con el fin de tener una potencia del 90% para detectar una diferencia del 40% en el riesgo de eccema entre los grupos de probióticos y placebo. Los resultados secundarios incluyeron resultados inmunológicos reportados aquí. Se evaluaron todas las muestras de CBMC disponibles y análisis primarios por intención fueron para tratar. Los datos se evaluaron utilizando histogramas y se transformaron datos asimétricos en logotipo. Los datos emparejados paramétricos se analizaron mediante la prueba t emparejado, y datos paramétricos no emparejados utilizando la prueba de rangos con signos Wilcoxon y prueba Sign. Los datos no emparejados paramétricos se analizaron mediante la prueba t independiente, y los datos no emparejados no paramétricos utilizando la prueba U de Mann Whitney. Los datos continuos se presentan como medias aritméticas  $\pm$  1 EEM o medianas con rangos intercuartiles. Los datos categóricos se analizaron utilizando la prueba de  $X^2$  o la prueba exacta de Fisher. El valor  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo, con la debida precaución en la interpretación de los resultados de comparaciones múltiples. Cuando el significado de los hallazgos no estaba claro se llevó a cabo un análisis de sensibilidad mediante al excluir los participantes en los que: (1) los datos de cumplimiento del tratamiento (conteos de cápsulas regresados) no estaban disponibles ( $n = 9$ ); (ii) los conteos de cápsula sugirieron los niveles de cumplimiento  $< 50\%$  ( $n = 2$ ); o (iii) no se tomaron cápsulas de tratamiento debido a un parto prematuro entre la aleatorización y 36 semanas de gestación ( $n = 1$ ). Los análisis se realizaron utilizando SPSS v 16.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Efectos del tratamiento de LGG sobre proliferación PBMC

Los efectos de LGG administrado por vía oral se evaluaron en adultos sanos. Se cosecharon PBMC de 11 adultos antes de y sobre la terminación de 7 días de tratamiento de LGG. El tratamiento se asoció con una reducción del 30% (CI 95% 11 a 50%;  $P = 0.03$ ) en respuesta proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> promedio a LGG muerto por calor (HKL) en comparación con respuestas proliferativas de los mismos sujetos antes del tratamiento de LGG. En contraste, no ha cambiado en la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> a OVA ( $P = 0.2$ ) o medio solo ( $P = 0.06$ ) después del tratamiento LGG.

Efectos del tratamiento de LGG sobre fenotipo DC

Se investigó el fenotipo DC en PB-MC cultivado recolectado de los adultos antes y después del tratamiento de LGG. El plasmocitoides DC (pDC) aumenta desde 3.20% hasta 5.29% de DDC total ( $P = 0.02$ ) después del tratamiento LGG, en PBMC cultivado durante 48 h con HKL. Una tendencia hacia un aumento de la proporción de PDC a mieloides (mDC) también se observó después del tratamiento de LGG en PBMC cultivado con HKL (relación de medio 0.36 de pretratamiento, 0.58 de postratamiento;  $P = 0.07$ ). El tratamiento de LGG no se asoció con cualquier cambio significativo en el fenotipo DC en PBMC cultivado con OVA o solo medio.

Los datos muestran que la administración oral de LGG para adultos sanos conduce a cambios sistémicamente detectables en las respuestas proliferativas de células T y fenotipo DC. Tanto la disminución de la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y el aumento en el número de pDC en PBMC cultivado con HKL son coherentes con la inducción de tolerancia específica a antígeno (Colonna et al, Nat Immunol 5: 1219-1226, 2004).

Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita aquí es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de aquellas descritas específicamente. Se debe entender que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones en la medida que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquier y todas las combinaciones de cualesquiera dos o más de dichas etapas o características en la medida en que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Bibliografía

Bauer et al, Allergy 54(8):894-895, 1999  
 Bernard et al, Allergy 58(12):1285-1292, 2003  
 Beyer et al, J Allergy Clin Immunol 109(4):7070-713, 2002  
 Bock, Pediatrics 79(5):683-688, 1987

- Bock et al, *J Allergy Clin Immunol* 107(1):191-193, 2001
- 5 Bock and Atkins, *J Allergy Clin Immunol* 83(5):900-904, 1989
- Boyle et al, *Am J Clin Nutr* 83(6):1256-1264, 2006
- Boyle et al, *Syst Rev*, October 8, 2008 Issue 4, CD006135
- 10 Buchanan et al, *J Allergy Clin Immunol* 119(1):199-205, 2007
- Chen et al, *Science* 265(5176):1237-1240, 1994
- 15 Chung et al, *J Allergy Clin Immunol* 109(1):150-154, 2002
- Chung et al, *J Leukoc Biol* 77(6):906-913, 2005
- Colonna et al, *Nat Immunol* 5:1219-1226, 2004
- 20 Daniel et al, *Allergy* 52(11):1237-1242, 2007
- Dunstan et al, *J Allergy Clin Immunol* 112:1178-1184, 2003
- Enrique et al, *J Allergy Clin Immunol* 116(5):1073-1079, 2005
- 25 Frossard et al, *J Allergy Clin Immunol* 114(2):377-382, 2004
- Groux et al, *Nature* 389(6652):737-742, 1997
- 30 Grundy et al, *J Allergy Clin Immunol* 110(5):784-789, 2002
- Gupta et al, *Thorax* 62(1):91-96, 2007
- Hamalaninen et al, *Anal Biochem* 299:63-70, 2001
- 35 Hourihane et al, *J Allergy Clin Immunol* 100(5):596-600, 1997
- Hourihane et al, *Bmj* 316(7140):1271-1275, 1998
- 40 Karlsson et al, *J Exp Med* 199(12):1679-1688, 2004
- Kemp et al, *Arch Intern Med* 155(16):1749-1754, 1995
- 45 Kerzl et al, *J Allergy Clin Immunol* 119(2):507-508, 2007
- Kieser and Friede, *Statistics in Medicine* 26:253-273, 2007
- Leung et al, *N Engl J Med* 348(11):986-993, 2003
- 50 Majamaa et al. *J Allerg Clin Immunol* 99(2): 179-185, 1997
- Matsuzaki and Chin, *Immunology & Cell Biology*, 78:67-73, 2000
- Meglio et al, *Allergy* 59(9):980-987, 2004
- 55 Mehr et al, *Paediatr Allergy Immunol* 18(5):448-452, 2006
- Mernard et al, *JPediatric Gastroenterology & Nutrition* 43:451-458, 2006
- 60 Mullins, *Med J Aust* 186(12):618-621, 2007 Nelson et al, *J Allergy Clin Immunol* 99(6 Pt1):744-751, 1997
- Norman, *J Allergy Clin Immunol* 113(6):1013-1023, 2004
- 65 Nucera et al, *Dig Dis Sci* 45(3):637-641, 2000

- Osborne and Sinn, Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity (Revisión), Cochrane Database Syst Rev Art No. CD006474, 2007
- 5 Osborne and Sinn, Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity (Revisión), Cochrane Database Syst Rev Art No. CD006475, 2007
- Pan et al, J Allerg Clin Immunol 117: S327, 2006
- 10 Patriarca et al, Aliment Pharmacol Ther 17(3):459-465, 2003
- Perez-Machado et al, Eur J Immunol 33(8):2307-2315, 2003 Primeau et al, Clin Exp Allergy 30(8):1135-1143, 2000
- Pumphrey, Curr Opin Allergy Clin Immunol 4(4):285-290, 2004
- 15 Rautava et al, Pediatr Res 60(2):221-224, 2006
- Roberts and Lack, J Allergy Clin Immunol 115(6):1291-1296, 2005
- Robertson et al, Med JAust 180(6):273-276, 2004
- 20 Rolinck-Werninghaus et al, Allergy 60(10):1320-1322, 2005
- Sampson, J Allergy Clin Immunol 107(5):891-896, 2001
- 25 Schabussora and Widermann, Curr Opin Allergy Clin Immunol 8(6):557-564, 2008
- Schmidt-Weber and Blaser, Springer Semin Immunopathol 25(3-4):377-390, 2004
- 30 Shida et al, Clin Exp Allergy 32:563-570, 2002
- Sicherer et al, Pediatrics 102(1):199-205, 1998
- Sicherer et al, Pediatrics 105(2):359-362, 2000
- 35 Sicherer et al, J Allergy Clin Immunol 112(6):1203-1207, 2003
- Skolnick et al, J Allergy Clin Immunol 107(2):367-374, 2001
- 40 Strobel and Mowat, Curr Opin Allergy Clin Immunol 6(3):207-213, 2006
- Tureanu et al, J Clin Invest 111(7):1065-1072, 2003
- Vander Leek et al, J Pediatr 137(6):749-755, 2000
- 45 Wensing et al, J Allergy Clin Immunol 110(6):915-920, 2002
- Young et al, Lancet 343(8906):1127-1130, 1994 US 7060687 B2

Reivindicaciones

1. Un probiótico y un alérgeno de alimento para uso en:

5 (a) tratar intolerancia a dicho alérgeno en un sujeto en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto;

10 (b) tratar una alergia inducida por el alérgeno en un sujeto al inducir tolerancia a dicho alérgeno, en donde dicho probiótico se va a utilizar en combinación con dicho alérgeno de alimento; o

(c) inducir tolerancia a dicho alérgeno en un sujeto en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto;

15 en donde el probiótico en (a), (b) y (c) se selecciona de la lista que consiste de una especie de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Saccharomyces*, *Streptococcus* y *Bacillus*.

2. Un probiótico y un alérgeno de alimento para uso como se reivindica en la reivindicación 1 en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se van a administrar en dos diferentes formulaciones.

20 3. Un probiótico y un alérgeno de alimento para uso como se reivindica en la reivindicación 1 o 2 en donde el probiótico es una especie de *Lactobacillus*.

25 4. Un probiótico y un alérgeno de alimento para uso como se reivindica en la reivindicación 3 en donde la especie de *Lactobacillus* se selecciona de la lista que consiste de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* immunitass, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus helvetirus*.

30 5. Un probiótico y un alérgeno de alimento para uso como se reivindica en la reivindicación 4 en donde el probiótico es *Lactobacillus rhamnosus*.

6. Un probiótico y un alérgeno de alimento para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el alérgeno de alimento es un alérgeno de leguminosas.

35 7. Un probiótico y un alérgeno de alimento para uso como se reivindica en la reivindicación 6 en donde el alérgeno de leguminosas es un alérgeno de maní.

8. Un probiótico y un alérgeno de alimento para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el sujeto es un humano.

40 9. Uso de un probiótico y un alérgeno de alimento en la fabricación de un medicamento para:

a) tratar intolerancia a dicho alérgeno en un sujeto en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto;

45 (b) tratar una alergia inducida por el alérgeno en un sujeto al inducir tolerancia a dicho alérgeno, en donde dicho probiótico se va a utilizar en combinación con dicho alérgeno de alimento; o

50 (c) inducir tolerancia a dicho alérgeno en un sujeto en donde dicho probiótico y alérgeno de alimento se van a administrar secuencial o simultáneamente a dicho sujeto;

en donde el probiótico en (a), (b) y (c) se selecciona de la lista que consiste de una especie de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Saccharomyces*, *Streptococcus* y *Bacillus*.

55 10. Uso de un probiótico y un alérgeno de alimento como se reivindica en la reivindicación 9 en donde el probiótico es una especie de *Lactobacillus*.

60 11. Uso de un probiótico y un alérgeno de alimento como se reivindica en la reivindicación 10 en donde la especie de *Lactobacillus* se selecciona de la lista que consiste de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* immunitass, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus helvetirus*.

12. Uso de un probiótico y un alérgeno de alimento como se reivindica en la reivindicación 11 en donde el probiótico es *Lactobacillus rhamnosus*.

65 13. Uso de un probiótico y un alérgeno de alimento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en donde el alérgeno de alimento es un alérgeno de leguminosas.

14. Uso de un probiótico y un alérgeno de alimento como se reivindica en la reivindicación 13 en donde el alérgeno de leguminosas es un alérgeno de maní.

5 15. Uso de un probiótico y un alérgeno de alimento como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14 en donde el sujeto es un humano.