

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 740**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61B 17/20 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2008 PCT/EP2008/066737**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09071599**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2008 E 08856600 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2217272**

54 Título: **Método inmunoterapéutico para aumentar en un sujeto la tolerancia a los cacahuetes**

30 Prioridad:

03.12.2007 FR 0759503
29.07.2008 US 84305 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2017

73 Titular/es:

DBV TECHNOLOGIES (100.0%)
177/181 avenue Pierre Brossolette
92120 Montrouge, FR

72 Inventor/es:

MONDOULET, LUCIE;
DUPONT, CHRISTOPHE;
BENHAMOU, PIERRE-HENRI y
DUPONT, BERTRAND

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 605 740 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

Método inmunoterapéutico para aumentar en un sujeto la tolerancia a los cacahuetes

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a nuevos métodos inmunoterapéuticos para aumentar en un sujeto la tolerancia a los cacahuetes. En particular, la presente invención describe el uso de un dispositivo de parche para la piel para la insensibilización progresiva a los cacahuetes de un sujeto.

Antecedentes de la invención

- 10 La alergia a los cacahuetes es una de las reacciones de hipersensibilidad inmediata a los alimentos más común y grave en términos de persistencia y gravedad de la reacción. De hecho, se estima que esta alergia está implicada en la mayoría de las anafilaxias letales y casi letales relacionadas con los alimentos en todos los grupos de edad. La prevalencia de esta alergia se ha duplicado en la última década y ahora afecta entre el 0,6% y el 1,2% de la población general (Sicherer et al., 2003).

- 15 Esta alergia tiende a presentarse en una etapa temprana de la vida y sólo el 20% de niños alérgicos llega a ser tolerante a los cacahuetes (Skolnick et al., 2001). La sensibilización se produce generalmente en el tracto gastrointestinal, pero también se puede producir como consecuencia de una sensibilización directa o cruzada por exposición por inhalación a cacahuetes o antígenos medioambientales de reacción cruzada, tal como el polen.

- 20 La reacción alérgica provocada por los cacahuetes es estrictamente una reacción de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE. El complejo IgE-alérgeno hace que reticulen receptores de mastocitos induciendo una cascada de transducción de señal que termina en la desgranulación y liberación de una variedad de mediadores, lo que da lugar a los síntomas clínicos de hipersensibilidad a los cacahuetes.

- 25 Los principales alérgenos de cacahuete son proteínas de almacenamiento de semillas. Aunque han sido documentados 9 alérgenos de cacahuete, es decir, Ara h 1 a Ara h 9 (Burks et al., 1992; Burks et al., 1991; Rabjohn et al., 1999; Koppelman et al., 2005; Mittag et al., 2004; Becker et al., 2001, Lauer et al., 2008), Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 se clasifican como los principales alérgenos de cacahuete debido a que generalmente se reconocen en más del 50% de pacientes alérgicos a los cacahuetes (Koppelman et al., 2001).

- El tratamiento preventivo de esta alergia consiste en evitarla, lo que es muy difícil debido al uso generalizado y con frecuencia enmascarado de cacahuetes en la industria alimentaria. Se pueden utilizar farmacoterapias actuales (antihistaminas y corticosteroides) para reducir los síntomas de una enfermedad alérgica pero no evitan la reacción alérgica.

- 30 La inmunoterapia es el único tratamiento disponible que puede modificar el curso natural de la enfermedad alérgica, reduciendo la sensibilidad a los alérgenos. Para inmunoterapia, se administra una dosis de un alérgeno con el fin de inducir progresivamente una respuesta inmunitaria caracterizada por la tolerancia al antígeno/alérgeno, también conocida como insensibilización. Este método está indicado particularmente para pacientes con reacciones alérgicas graves dependientes de IgE.

- 35 A pesar de que la inmunoterapia se ha estado utilizando durante más de 90 años, el mecanismo exacto de su acción todavía no está claro. En los seres humanos implica: (i) un aumento de la IgG, en particular IgG4, que es un anticuerpo bloqueante que puede bloquear mecanismos mediados por IgE inhibiendo la liberación de mediadores inflamatorios de mastocitos y basófilos, (ii) un aumento de linfocitos T reguladores (Treg) lo que conduce a un mejor equilibrio del perfil Th2/Th1 y (iii) la producción de linfocitos T productores de IL-10, conocida también como factor inhibidor de la síntesis de citoquinas humanas (CSIF), que contrarresta el efecto inflamatorio de los mastocitos y promueve la producción de IgG4.

Hasta ahora, la inmunoterapia podía ser administrada por vías subcutánea, sublingual o intra-nasal.

- 45 La inmunoterapia subcutánea es el tratamiento más común utilizado por los alergólogos. Sin embargo, este método es bastante caro y requiere un profesional especializado para cada inyección. Un inconveniente importante de la inmunoterapia subcutánea es sus efectos secundarios alérgicos. Estos efectos secundarios pueden ser locales o sistémicos. Se ha demostrado que las inmunoterapias para la alergia a los cacahuetes que utilizan la vía subcutánea inducen una alta tasa de reacción sistémica adversa (hasta 50%) (Nelson et al., 1997 y Oppenheimer et al., 1992). Los efectos secundarios sistémicos son causados por alérgenos que han sido inyectados inadvertidamente en pequeños vasos sanguíneos subcutáneos, o alérgenos que se difunden en los vasos sanguíneos subcutáneos. Los alérgenos pueden ser transportados a otros órganos, tales como el pulmón o sitios distantes de la piel, donde pueden provocar asma o urticaria. También pueden causar anafilaxia que puede producir la muerte. En consecuencia, las alergias con altos riesgos de anafilaxia, tal como la alergia a los cacahuetes, no pueden ser tratadas por vía subcutánea.

La inmunoterapia sublingual fue aceptada por la OMS como una alternativa válida a la vía subcutánea y se debe utilizar en todos los pacientes que requieran inmunoterapia y no toleren la vía subcutánea de administración de alérgenos. Sin embargo, la dosis de alérgeno requerida para la inmunoterapia sublingual es mayor que para la inmunoterapia subcutánea y este método algunas veces induce algunos efectos adversos locales, tales como prurito oral, irritación de garganta, hinchazón de la lengua o garganta.

La inmunoterapia intra-nasal es otra alternativa a la vía subcutánea que ha demostrado ser eficaz para la rinitis estacional y el tratamiento del asma (Hufnagl et al., 2008). Sin embargo, esta vía no es generalmente bien tolerada por los pacientes y la mayoría de ellos interrumpe prematuramente su tratamiento (Pajno et al., 2005).

En consecuencia, existe la necesidad de un método de inmunoterapia para el tratamiento de la alergia a los cacahuets que sea seguro, eficaz y bien tolerado por los pacientes.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un nuevo método de inmunoterapia para alergias a los cacahuets. Más específicamente, la invención muestra, por primera vez, que la inmunoterapia eficaz para alergias a los cacahuets se puede lograr por vía epicutánea.

La presente invención proporciona un nuevo método inmunoterapéutico para aumentar en un sujeto la tolerancia a los cacahuets, que comprende administrar repetidamente a dicho sujeto una o más proteínas derivadas del cacahuete por vía epicutánea por medio de un dispositivo de parche para la piel que comprende un soporte, estando adaptada la periferia de dicho soporte para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada, en donde el soporte lleva dentro de la cámara sobre el lado que va a estar en contacto con la piel dichas una o más proteínas en una dosis suficiente para inducir una reacción inmunológica en dicho sujeto después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel, separándose dichas una o más proteínas del soporte después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel y a partir de ese momento suministrándose al sujeto por vía epicutánea, conduciendo dicha administración, por repetición, a un aumento progresivo en el sujeto de la tolerancia a los cacahuets.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo de parche para la piel que comprende un soporte, estando adaptada la periferia de dicho soporte para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada, en donde el soporte lleva dentro de la cámara sobre el lado que va a estar en contacto con la piel una o más proteínas procedentes de cacahuets en una dosis suficiente para inducir una reacción inmunológica en dicho sujeto después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel, separándose dichas una o más proteínas procedentes de cacahuets del soporte después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel y a partir de ese momento suministrándose al sujeto por vía epicutánea.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere (al uso de) a un dispositivo de parche para la piel que comprende un soporte, estando adaptada la periferia de dicho soporte para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada, en donde el soporte lleva dentro de la cámara sobre el lado que va a estar en contacto con la piel una o más proteínas procedentes de cacahuets en una dosis suficiente para inducir una reacción inmunológica en un sujeto después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel, separándose dichas una o más proteínas procedentes de cacahuets del soporte después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel y a partir de ese momento suministrándose al sujeto por vía epicutánea, (en la fabricación de una composición) para aumentar en un sujeto la tolerancia a los cacahuets.

En otro aspecto, la presente invención se refiere también a un kit de parches que comprende una pluralidad de dispositivos de parche para la piel, comprendiendo cada uno de dichos dispositivos un soporte, estando adaptada la periferia de dicho soporte para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada, en donde el soporte lleva dentro de la cámara sobre el lado que va a estar en contacto con la piel una o más proteínas procedentes de cacahuets en una dosis suficiente para inducir una reacción inmunológica en dicho sujeto después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel, separándose dichas una o más proteínas procedentes de cacahuets del soporte después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel y a partir de ese momento suministrándose al sujeto por vía epicutánea. Los diferentes parches del kit pueden contener la misma o una cantidad diferente de alérgeno de cacahuete haciendo por lo tanto posible mantener o aumentar/disminuir las dosis de alérgenos en el transcurso del método inmunoterapéutico de la invención.

La invención se puede usar en cualquier sujeto, en particular cualquier sujeto humano, incluyendo niños y adultos. Preferiblemente, el sujeto es alérgico a los cacahuets.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra niveles específicos de IgE, IgG1, IgG2a en suero de ratón al final de la sensibilización (día 43).

La Figura 2 es un gráfico que muestra citoquinas segregadas por esplenocitos reactivados de ratones sensibilizados por extracto de proteína de cacahuete (abreviadamente PPE, por las siglas en inglés de *Peanut Protein Extract*) por

vía oral. Se aislaron células del bazo de ratones BALB/c sensibilizados por vía oral y se reactivaron *ex vivo* con PPE durante 60 horas. Se cuantificaron las citoquinas en el líquido sobrenadante por un inmunoensayo enzimático (EIA).

La Figura 3 es un gráfico que muestra niveles de histamina en muestras de plasma obtenidas de ratones sensibilizados y de control después de inoculación por vía oral. La histamina se ensayó por EIA competitivo.

5 La Figura 4 es un gráfico que muestra las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) medidas 24 horas después de una sola inoculación de proteínas de cacahuets en la almohadilla plantar y expresadas como incremento medio del hinchazón de la almohadilla plantar (SEM). Inicial: medida de la almohadilla plantar antes de la inyección de PPE o PBS. Se inyectó PBS en la almohadilla plantar derecha y PPE en la otra almohadilla. La hinchazón de cada almohadilla plantar se midió 24 horas después de la inyección.

10 La Figura 5 muestra el patrón electroforético (en condiciones desnaturalizantes y reductoras) de la formulación del PPE.

La Figura 6 muestra un gráfico que representa la concentración de la IgE específica en ratones de control y ratones sensibilizados insensibilizados por vía epicutánea (VE) o no tratados (NT). Los resultados se expresan como la media en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ +/- DT.

15 La Figura 7 muestra un gráfico que representa la concentración de la IgG2a específica en ratones de control y ratones sensibilizados insensibilizados por vía epicutánea (VE) o no tratados (NT). Los resultados se expresan como la media en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ +/- DT.

La Figura 8 muestra un gráfico que representa la relación IgG1/IgG2a para el grupo de ratones de insensibilización (VE), no tratados (NT) y de control (C). Los resultados se muestran después de 8 semanas y 16 semanas de insensibilización.

20 La Figura 9 muestra un gráfico que representa la concentración de histamina en muestras de plasma después de inoculación por vía oral de ratones de control y ratones sensibilizados insensibilizados por vía epicutánea (VE) o no tratados (NT). Los resultados se expresan como la media en nM +/- DT. * p < 0,05, ** p < 0,001, *** p < 0,001.

25 La Figura 10 muestra un gráfico que representa la concentración de la IgA específica de cacahuets en muestras de suero en ratones tratados (VE) con una formulación del PPE o no tratados (NT) y de control. Los resultados en ratones sensibilizados (S0) y después de 8 (S8) y 16 semanas (S16) de insensibilización se expresan en densidad óptica (DO) a 450 nm. * p < 0,05, ** p < 0,001, *** p < 0,001.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se refiere a un método inmunoterapéutico para aumentar en un sujeto la tolerancia a los cacahuets usando la administración epicutánea. Este método es particularmente seguro para el paciente teniendo en cuenta que no se ha demostrado que los alérgenos atraviesen la piel y se incorporen al torrente sanguíneo. Este método podría evitar así a pacientes alérgicos graves el riesgo importante de reacciones sistémicas o anafilácticas durante el protocolo de inmunoterapia. Además, los resultados obtenidos por los autores de la presente invención muestran que la insensibilización a los cacahuets por vía epicutánea de acuerdo con la presente invención es al menos tan eficaz como la insensibilización usando otras vías de administración, en particular la vía intradérmica.

En particular, la presente invención muestra que una reacción inmunológica específica provocada por la aplicación a la piel de alérgenos de cacahuete de acuerdo con esta invención induce una modificación del sistema inmunitario del sujeto y conduce en el sujeto a un aumento progresivo de la tolerancia a los cacahuets.

40 El método inmunoterapéutico de la invención implica la administración de una composición de alérgenos de cacahuete a un sujeto por vía epicutánea usando dispositivos particulares de parche, lo que conduce a la tolerancia.

Como se utiliza en esta memoria, el término "vía epicutánea" significa la administración de un alérgeno a un sujeto por aplicación de este alérgeno a la piel. La vía epicutánea no requiere el uso de aguja, jeringa o de cualquier otro medio que perfora o altere la integridad de la capa superficial de la epidermis. El alérgeno se mantiene en contacto con la piel durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el alérgeno penetre en el estrato córneo de la epidermis. Esta difusión induce la migración y la activación de las células de Langerhans promoviendo así una reacción inmunológica.

El término "tolerancia" se define en la presente memoria como una reducción de la reactividad inmunológica de un sujeto hacia alérgenos específicos, en la presente memoria alérgenos de cacahuete.

50 Como se utiliza en esta memoria, el término "cacahuete" significa una especie en la familia de las leguminosas *Fabaceae*, por ejemplo *Arachis*. Los cacahuets también son conocidos en inglés como *earthnuts*, *goobers*, *goober peas*, *pindas*, *jack nuts*, *pinders*, *manila nuts* y *monkey nuts*.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "alérgeno de cacahuete" se refiere a cualquier proteína o péptido procedente del cacahuete que es capaz de provocar una reacción alérgica. Este alérgeno se puede seleccionar de alérgenos naturales u originarios, alérgenos naturales modificados, alérgenos sintéticos, alérgenos recombinantes, alergoides y sus mezclas o combinaciones. Preferiblemente, los alérgenos seleccionados son capaces de producir una hipersensibilidad de tipo inmediato mediada por IgE. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en esta memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son un residuo modificado, o un residuo de origen no natural, tal como un compuesto mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

En la presente memoria, el término "proteína procedente de cacahuete" se refiere a cualquier proteína que se puede obtener del cacahuete o que comprende una porción o una secuencia de una proteína obtenible del cacahuete. En una realización particular, la proteína se selecciona de proteínas de almacenamiento de semillas. Preferiblemente, la proteína se selecciona de Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7, Ara h 8 y Ara h 9 de *Arachis hypogaea*. En una realización más preferida, la proteína procedente de cacahuete comprende al menos Ara h 1, Ara h 2 o Ara h 3 o sus isoformas. Las secuencias de aminoácidos de Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 son conocidas por los expertos en la técnica. Como ilustración, los números de acceso al Genbank de la proteína Ara h 1, dos isoformas de Ara h 2 y dos isoformas de Ara h 3 son, respectivamente, AAL27476, AAM78596, AAN77576, AAT39430 y AAC63045. Estas proteínas se pueden obtener a partir de un extracto de cacahuete o ser producidas por un organismo recombinante, tal como bacterias modificadas genéticamente, levaduras o por cualesquiera otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estas proteínas se pueden utilizar en combinación o por separado. Se debe entender que el término "proteína procedente de cacahuete" también incluye fragmentos o variantes de los antígenos anteriores, tales como fragmentos que contienen epítopos o proteínas obtenidas del cacahuete y, posteriormente modificadas enzimática, química, mecánica o térmicamente.

En una realización particular, la composición de alérgenos de cacahuete comprende una o más proteínas procedentes de cacahuete.

En otra realización, la composición de alérgenos de cacahuete comprende una o más proteínas procedentes de cacahuete seleccionadas de Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3, opcionalmente en combinación con otras proteínas procedentes de cacahuete.

En otra realización, la composición de alérgenos de cacahuete comprende un extracto de cacahuete como fuente de proteínas procedentes de cacahuete.

Un extracto de cacahuete designa cualquier preparación (lisado, filtrado, homogeneizado, etc....) obtenida de cacahuete. El extracto de cacahuete se puede utilizar directamente o los alérgenos de cacahuete se pueden purificar al menos parcialmente a partir de este extracto. Este proceso de purificación puede implicar filtración, centrifugación, precipitación o cualesquiera otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Preferentemente, las proteínas procedentes de cacahuete y administradas al sujeto están al menos parcialmente purificadas.

En una realización, la composición de alérgenos de cacahuete está en forma líquida, tal como una solución o una dispersión de partículas. En ese caso, la administración epicutánea eficaz está garantizada por migración del alérgeno desde la fase líquida de la composición de alérgenos hasta la piel con el fin de permitir que el alérgeno penetre en el estrato córneo de la epidermis. En una realización particular, la migración del alérgeno de la fase líquida de la composición de alérgenos está garantizada por difusión del alérgeno a través de la condensación formada dentro de la cámara herméticamente cerrada, por ejemplo, como resultado de la transpiración.

En otra realización, la composición de alérgenos de cacahuete está en forma seca, en particular en forma de partículas, obtenidas, por ejemplo, por liofilización. La presente invención muestra en realidad que una tolerancia eficaz a los cacahuetes se puede lograr utilizando una preparación de alérgenos de cacahuete en forma sólida (por ejemplo, seca). Es ventajoso el uso de proteínas en forma de partículas. De hecho, dichos alérgenos en partículas pueden estar unidos directamente al soporte del dispositivo, evitando con ello cualquier interacción química o cualquier reacción que pueda alterar la inmunogenicidad de estas proteínas. Además, el uso de las partículas permite conservar la sustancia en un envase adecuado, de manera que ya no sea necesario realizar una preparación extemporánea. En este caso, la administración epicutánea de alérgenos de cacahuete mantenidos en el soporte del parche se puede garantizar por disolución de estos alérgenos en la condensación formada dentro de la cámara herméticamente cerrada.

En cada realización, la condensación presente dentro de la cámara herméticamente cerrada puede provenir de la transpiración condensada segregada por la piel.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "transpiración" o "sudoración" significa la producción de un fluido que es segregado por las glándulas sudoríparas de la piel de los mamíferos. Este fluido contiene principalmente agua, pero también diversos minerales y oligoelementos disueltos. En la presente invención, la transpiración segregada por la piel se evapora y se condensa dentro de la cámara herméticamente cerrada.

El término "condensación" se refiere, en esta memoria descriptiva, al cambio del estado físico de la materia desde la fase gaseosa a la fase líquida, particularmente el cambio de la transpiración evaporada a una fase líquida. La condensación formada por la transpiración dentro de la cámara después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel provoca o aumenta la retirada y suministro epicutáneo de los alérgenos. De hecho, los alérgenos se pueden disolver en el agua contenida en la transpiración condensada y a partir de ahí ser suministrados al sujeto por vía epicutánea.

La composición de alérgenos puede comprender además componentes adicionales, tales como adyuvantes.

En una realización, la composición de alérgeno de cacahuete usada en la presente invención se formula sin ningún adyuvante. La invención muestra en realidad que la inmunoterapia de cacahuetes se puede realizar por vía epicutánea sin necesidad de adyuvante adicional.

En otra realización, la composición de alérgenos de cacahuete usada en la presente invención comprende o se aplica con un adyuvante. En el contexto de esta invención, un adyuvante designa cualquier sustancia que actúe para activar, acelerar, prolongar o potenciar las respuestas inmunitarias específicas de antígenos cuando se utiliza en combinación con un antígeno específico. Los compuestos adyuvantes que se pueden utilizar en combinación con alérgenos de cacahuete incluyen sales minerales, tales como fosfato de calcio, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio; DNA o RNA inmunoestimulador, tales como oligonucleótidos CpG; proteínas, tales como anticuerpos o proteínas que se unen a receptores de tipo Toll; saponinas, por ejemplo, QS21; citoquinas; derivados de muramilo dipéptidos; LPS; MPL y derivados que incluyen 3D-MPL; GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos); imiquimod; partículas coloidales; adyuvante completo o incompleto de Freund; adyuvante de Ribí o toxina bacteriana, por ejemplo, toxina o enterotoxina (TL) del cólera. En una realización particular, la composición de alérgenos de cacahuete se formula con enterotoxina.

El dispositivo de parche para la piel usado en el método de la invención comprende un soporte, estando adaptada la periferia de dicho soporte para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada. Este soporte lleva dentro de la cámara sobre el lado que va a estar en contacto con la piel la composición de alérgenos de cacahuete utilizada para inducir una reacción inmunitaria.

El término "cámara herméticamente cerrada" tal como se utiliza en la presente memoria, significa que el soporte del parche es impermeable a la humedad y que la periferia de este soporte constituye una barrera oclusiva definiendo de este modo un espacio cerrado. Se requiere que la impermeabilidad a la humedad de esta cámara permita que los alérgenos sean retirados del soporte, por ejemplo, por disolución o extracción, debido al efecto de humedad dentro de dicha cámara y siendo posteriormente suministrados al sujeto. La eficacia del parche está condicionada en gran medida por la creación de esta fase líquida, en la que el alérgeno está en solución o en suspensión, promoviendo así su paso a través de los poros.

El término "humedad" como se utiliza en la presente memoria, significa la presencia de agua u otro líquido, ya sea en fase líquida o de vapor.

Preferiblemente, la periferia del soporte tiene propiedades adhesivas y forma una junta hermética para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada.

En una realización particular, los alérgenos de cacahuete se mantienen sobre el soporte por medio de fuerzas electrostáticas y/o de Van der Waals. Esta realización es particularmente adecuada cuando los alérgenos de cacahuete están en forma sólida (por ejemplo, partículas), aunque también se puede utilizar, indirectamente, cuando los alérgenos están en forma líquida.

En el contexto de la presente invención, el término "fuerza electrostática" designa generalmente cualquier fuerza no covalente que implique cargas eléctricas. El término fuerzas de Van der Waals designa fuerzas no covalentes creadas entre la superficie del soporte y el alérgeno sólido y pueden ser de tres tipos: fuerzas entre dipolos permanentes, fuerzas entre dipolos inducidos y fuerzas de London-Van der Waals. Las fuerzas electrostáticas y las fuerzas de Van der Waals pueden actuar por separado o juntas.

A este respecto, en una realización preferida, el dispositivo de parche comprende un soporte electrostático. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "soporte electrostático" indica cualquier soporte hecho de un material capaz de acumular cargas electrostáticas y/o generar fuerzas de Van der Waals, por ejemplo, por frotamiento, calentamiento o ionización, y de conservar dichas cargas. El soporte electrostático incluye típicamente una superficie con cargas espaciales, que pueden estar dispersadas uniformemente o no. Las cargas que aparecen sobre un lado u otro de la superficie del soporte pueden ser positivas o negativas, dependiendo del material que constituye dicho soporte y del método utilizado para crear las cargas. En todos los casos, las cargas positivas o negativas distribuidas sobre la superficie del soporte producen fuerzas de atracción sobre los materiales conductores o no conductores, permitiendo de este modo mantener el alérgeno. Las partículas también pueden estar ionizadas, produciendo de este modo el mismo tipo de fuerzas electrostáticas de atracción entre las partículas y el soporte.

Ejemplos de materiales adecuados para proporcionar soportes electrostáticos son vidrio o un polímero elegido del grupo que comprende plásticos de celulosa (CA, CP), polietileno (PE), poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(cloruros de vinilo) (PVC), polipropilenos, poliestirenos, policarbonatos, poliacrílicos, en particular poli(metacrilato de metilo) (PMMA) y fluoropolímeros (por ejemplo, PTFE). La lista anterior no es de ningún modo limitativa.

- 5 La parte posterior del soporte puede estar cubierta con una etiqueta que puede ser retirada justo antes de la aplicación. Esta etiqueta hace que sea posible, por ejemplo, almacenar el alérgeno de cacahuete en la oscuridad cuando el soporte es al menos parcialmente translúcido.

- 10 La intensidad de la fuerza entre una superficie y una partícula se puede aumentar o disminuir por la presencia de una película delgada de agua debido a la presencia de humedad. Generalmente, el parche se fabrica y se mantiene en un lugar seco. La humedad debe ser suficientemente baja para permitir que se conserve el ingrediente activo. El índice de humedad se puede regular con el fin de obtener las máximas fuerzas de adhesión.

- 15 Como se ha expuesto anteriormente, el uso de un soporte electrostático es particularmente ventajoso cuando el alérgeno está en forma seca, por ejemplo, en forma de partículas. Además, el tamaño de partículas puede ser ajustado por el experto en la técnica para mejorar la eficacia de las fuerzas electrostáticas y/o de Van der Waals, para mantener las partículas sobre el soporte. Preferiblemente, el tamaño de las partículas está en el intervalo de 1 a 60 micrómetros.

- 20 En una realización específica, el parche comprende un soporte de polímero o metal o de polímero recubierto de metal y las partículas de alérgenos de cacahuete se mantienen sobre el soporte esencialmente por medio de fuerzas de Van der Waals. Preferiblemente, para mantener las partículas sobre el soporte por fuerzas de Van der Waals, el tamaño medio de las partículas es inferior a 60 micrómetros.

En otra realización, los alérgenos de cacahuete se mantienen sobre el soporte por medio de un recubrimiento adhesivo sobre el soporte. El soporte puede estar completamente cubierto con un material adhesivo o sólo parcialmente. Se pueden utilizar diferentes soportes oclusivos, tales como películas de polietileno o PET recubiertas con aluminio, o espumas de PE, PVC o PET con una capa adhesiva (acrílica, de silicona, etc.).

- 25 La composición de alérgenos de cacahuete en forma de partículas se puede cargar sobre el soporte por medio de un proceso de secado por pulverización, tal como un proceso de electropulverización como se ha descrito en la solicitud de patente francesa nº 08 50406. Un dispositivo de electropulverización usa alto voltaje para dispersar un líquido en el aerosol fino. Los alérgenos disueltos en un disolvente se pulverizan entonces sobre el soporte del parche donde se evapora el disolvente, dejando los alérgenos en forma de partículas. El disolvente puede ser, por ejemplo, agua o etanol, de acuerdo con el tiempo de evaporación deseado. Otros disolventes pueden ser elegidos por los expertos en la técnica. Este tipo de proceso para aplicar sustancias sobre el soporte del parche permite partículas de tamaño nanométrico y del mismo tamaño con un reparto de partículas regular y uniforme sobre el soporte. Esta técnica se adapta a cualquier tipo de parche, tal como parche con soporte que comprende polímero aislante, polímero dopado o polímero recubierto con una capa conductora. Preferiblemente, el soporte comprende un material conductor.

- 35 En otra realización, la periferia del soporte está cubierta con un polímero hidrófilo seco, capaz de formar una película adhesiva de hidrogel por contacto con la piel humedecida (como se describe en la solicitud de patente francesa nº 07 57970). En esta realización, la piel tiene que ser humedecida antes de la aplicación del parche. Cuando el hidrogel entra en contacto con la piel humedecida, las partículas de polímero absorben el líquido y se vuelven adhesivas, creando de este modo una cámara herméticamente cerrada cuando se aplica el parche a la piel.
- 40 Ejemplos de dichos hidrogeles incluyen polivinilpirrolidona, poliacrilato de Na, copolímero de metilviniléter y anhídrido maleico.

- 45 En otra realización particular, la composición líquida de alérgenos de cacahuete se mantiene sobre el soporte del parche en un depósito de material absorbente. La composición puede consistir en una solución de alérgenos o en una dispersión de los alérgenos, por ejemplo, en glicerina. El material adsorbente puede estar hecho, por ejemplo, de acetato de celulosa.

El soporte puede ser rígido o flexible, puede o no puede ser hidrófilo y puede o no puede ser translúcido, dependiendo del material constituyente. En el caso de vidrio, el soporte puede fabricarse resistente a la rotura uniéndolo a una lámina de plástico al vidrio.

- 50 En una realización, el soporte del parche contiene una zona transparente que permite observar y controlar directamente la reacción inflamatoria, sin necesidad de tener que retirar el parche. Materiales transparentes adecuados incluyen película de polietileno, película de poliéster [(poli(tereftalato de etileno))], policarbonato y cada película o material biocompatible transparente o translúcido.

- 55 En una realización particular, la porción del soporte que lleva el alérgeno no está en contacto directo con la piel. En esta realización, la altura de la cámara definida por el soporte, la periferia del soporte y la piel está en el intervalo de 0,1 mm a 1 mm.

El método de la invención implica típicamente la administración repetida al sujeto de uno o más alérgenos de cacahuete como se ha descrito anteriormente, dando lugar en el sujeto a un aumento progresivo de la tolerancia.

La dosis específica de alérgenos, así como el número de aplicaciones y la duración del contacto pueden ser adaptadas por el experto en la técnica, dependiendo del sujeto, la naturaleza de la preparación de alérgenos, el tipo de dispositivo de parche usado, etc.

Generalmente, el método comprende la aplicación de al menos dos dispositivos de parche como se ha descrito anteriormente, preferiblemente al menos 3, 5, 10 o 15, durante un período de tiempo comprendido entre una semana y años. El tratamiento se puede detener en cualquier momento, por ejemplo, una vez que se ha establecido una tolerancia eficaz.

En una realización, el método de la invención implica la aplicación repetida de 1 a 4 parches al día, al menos una vez a la semana, durante un período de 1 mes a varios años. En una realización preferida, el método de la invención implica la aplicación de 1 parche al día, cada día, o al menos una vez a la semana, durante un período de 1 mes a varios años. La duración del contacto del parche con la piel para cada aplicación está en el intervalo de 1 a 24 horas, preferiblemente alrededor de 8 horas.

La cantidad de alérgenos de cacahuete en cada parche está típicamente en el intervalo de 0,1 a 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de superficie de parche, preferiblemente en el intervalo de 20 a 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de superficie de parche, más preferiblemente en el intervalo de 20 a 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de superficie de parche. La superficie de parche está en el intervalo de 1 cm^2 a 10 cm^2 , preferiblemente en el intervalo de 1 cm^2 a 5 cm^2 .

Para su aplicación, los dispositivos de parche se pueden aplicar directamente a la piel, sin ningún tratamiento previo, preferiblemente sobre una parte sin pelo del cuerpo. Alternativamente, la piel se puede tratar antes de la aplicación del dispositivo, para alterar el estrato córneo, para eliminar los pelos o simplemente para producir la hidratación de la piel, en el sitio de contacto con el dispositivo de parche. Para aumentar eficazmente la tolerancia del sujeto a los cacahuetes, se administran preferiblemente alérgenos de cacahuete en una dosis suficiente para inducir en el sujeto una reacción inmunológica.

Esta reacción inmunológica puede implicar una reacción inflamatoria que conduce a una cascada de episodios bioquímicos que afectan al sistema vascular local y al sistema inmunitario. La reacción inflamatoria es bien moderada en forma de eritema (primer elemento clínico de la reacción inflamatoria) o en forma de una pápula que indica también la presencia de un edema local (otro componente de la reacción inflamatoria). La reacción inflamatoria inducida por la aplicación de alérgenos de cacahuete por vía epicutánea puede ser visible o no visible a simple vista.

Como se describe en el apartado experimental, el método de la invención da como resultado una reducción de los niveles de la IgE específica y un aumento de algunos niveles de la IgG específica, en particular de los niveles de la IgG4, lo que conduce a un aumento progresivo de la tolerancia a los cacahuetes. El término "Ig específica" se refiere en la presente memoria a inmunoglobulinas que son específicas de al menos un alérgeno al que es alérgico el sujeto. En una realización preferida, estas inmunoglobulinas son específicas de al menos una proteína procedente del cacahuete, especialmente Ara h 1, Ara h 2 o Ara h 3 o sus isoformas.

El método de la invención conduce también a una desviación inmunitaria desde un perfil Th2 dominante hasta un perfil Th1/Th2 más equilibrado. En otras palabras, el método de la invención provoca un aumento de una respuesta Th1 a las proteínas administradas. Los linfocitos Th1 y Th2 son dos tipos de linfocitos T cooperador CD4+ que difieren en su patrón de producción de citoquinas. Los linfocitos Th1 producen IFN- γ , IL-2 y TNF- β y están implicados en respuestas inmunitarias mediadas por células que son beneficiosas en la defensa del hospedante contra los patógenos intracelulares y células malignas, pero perjudiciales en la mediación de la autoinmunidad. Los linfocitos Th2 segregan IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, lo que aumenta las respuestas de anticuerpos, incluyendo la producción de IgE, y protegen contra las infestaciones parasitarias pero también pueden producir alergia y asma. Las respuestas Th1 y Th2 son mutuamente antagónicas, de tal manera que existen normalmente en equilibrio y se regulan entre sí. En un sujeto alérgico, se altera el equilibrio Th1/Th2 y es predominante el perfil Th2. Una desviación inmunitaria desde el perfil Th2 dominante hasta un perfil Th1/Th2 más equilibrado significa una desviación de un estado alérgico a un estado de tolerancia. Esta desviación, mediada por un aumento de linfocitos Treg, puede ser evaluada por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, tal como una disminución de la relación IgG1/IgG4 o el análisis de la producción de citoquinas.

En una realización preferida, el método de la invención está libre de efectos sistémicos. Probablemente se observará una reacción inflamatoria en la piel del sujeto sólo en el sitio de la administración epicutánea o en la periferia inmediata de este sitio. Esta reacción inflamatoria puede ser modulada por la dosis de alérgeno extendida sobre el soporte.

La presente invención proporciona también un dispositivo de parche para la piel, como se ha descrito anteriormente, que comprende un soporte, estando adaptada la periferia de dicho soporte para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada, en donde el soporte lleva dentro de la cámara sobre el lado que va a estar en contacto con

la piel uno o más alérgenos de cacahuete, como se ha descrito en la presente memoria, en una dosis suficiente para inducir una reacción inmunológica en la piel de dicho sujeto después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel, separándose dichos uno o más alérgenos del soporte después de la aplicación a la piel del dispositivo de parche y a partir de ese momento suministrándose al sujeto por vía epicutánea.

- 5 La presente invención se refiere también al uso de un dispositivo de parche para la piel como se ha descrito anteriormente, en la fabricación de una composición para aumentar la tolerancia a los cacahuets en un sujeto alérgico a los cacahuets.

La presente invención se refiere también al uso de un dispositivo de parche para la piel como se ha descrito anteriormente, en la fabricación de una composición para aumentar una respuesta inmunitaria de tipo Th1 a los cacahuets en un sujeto alérgico a los cacahuets.

10 La presente invención se refiere también a un kit de parches que comprende una pluralidad de parches como se ha descrito anteriormente, conteniendo los parches del kit la misma o una cantidad diferente de alérgenos de cacahuete. Además, la composición de alérgenos utilizada en los parches del kit puede ser la misma o diferente. Por ejemplo, se pueden utilizar diferentes proteínas de cacahuete, con o sin adyuvante. Preferiblemente, la misma

15 composición se utiliza en el transcurso del tratamiento de insensibilización.

Los siguientes ejemplos se dan con fines de ilustración y de ningún modo de limitación.

Ejemplos

Métodos

Animales y extractos de proteínas

20 Ratones BALB/c hembras de cuatro semanas, comprados a Charles River Laboratories (Francia), se sensibilizaron a proteínas de cacahuete. El uso de ratones BALB/c como modelo de murino de sensibilización a proteínas de cacahuete ha sido descrito en Adel-Patient et al., 2005. Este modelo debe reproducir la especificidad fina de IgE y los síntomas que se observan en los seres humanos por su inoculación. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas de la Comunidad Europea sobre el cuidado de los animales.

25 Se preparó extracto de cacahuete mezclando polvo de cacahuete (Allergon, Suecia) con tampón de fosfato 20 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 1 M durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de centrifugación, el líquido sobrenadante se mantuvo como extracto de proteínas de cacahuete (PPE). A continuación, se dializó el PPE y se cuantificó el contenido de proteínas por ensayo con ácido bicinonínico (BCA) y se analizó por SDS-PAGE. Los niveles de endotoxinas eran inferiores a 0,06 ng/mL (kit de E-toxato, Sigma, Francia).

Protocolo de sensibilización

30 Ocho ratones BALB/c recibieron 1 mg del PPE homogeneizado mezclado con 10 µg de toxina del cólera (TC) los días 1, 6, 12, 18, 24, 30 por medio de alimentación por sonda intragástrica. Se recogieron los sueros del plexo venoso retro-orbital los días 0, 18 y 43, se centrifugaron y las muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis. A ratones no tratados previamente se les extrajo sangre los mismos días (n = 8). Se controló la

35 sensibilización por parámetros biológicos como se ha definido anteriormente.

Protocolo de insensibilización

La insensibilización se realizó una vez a la semana durante 8 y 16 semanas por vía epicutánea (VE) como sigue:

Los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con ketamina y xilacina y se afeitaron con una maquinilla eléctrica y crema depilatoria. Al día siguiente, se colocaron en los lomos de los ratones y se mantuvieron con un vendaje durante 48 horas, dispositivos de parche para la piel con un soporte que llevaba 100 µg de PPE en forma seca, estando adaptada la periferia de dicho soporte para crear con la piel del ratón una cámara herméticamente cerrada.

40

Inoculación de alérgenos y cuantificación de la liberación de histamina

Los ratones se mantuvieron en ayunas durante una noche y se estimularon con alimentación por sonda intragástrica con el PPE de 10 mg por ratón dividido en 2 dosis a intervalos de 30 minutos. Los ratones no tratados previamente se inoculaban de la misma manera. Para determinar los niveles de histamina en plasma, se recogió sangre 30 minutos después de la segunda inoculación por alimentación por sonda intragástrica y se conservó a -20°C hasta su análisis. Los niveles de histamina se determinaron usando un kit de inmunoensayo enzimático (SPI-BIO, Francia) como había descrito por el fabricante.

45

Cuantificación de IgE, IgG1, IgG2a específicas

Se recogieron muestras de sangre del plexo venoso retro-orbital antes y durante la inmunoterapia y el plasma se conservó a -30°C hasta su posterior análisis.

Se utilizó un ELISA cuantitativo, validado usando las directrices de la ICH, para IgE, IgG1 e IgG2a específicas. Expresado brevemente, se recubrieron placas de microtitulación con PPE a una concentración de 10 µg/mL. Se distribuyeron diluciones en serie de 100 µL de cada suero por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 4°C. Se utilizó como trazador un anticuerpo anti-ratón IgG1 o IgG2a marcado con fosfatasa alcalina (Serotec, Inglaterra). Como sustrato enzimático se utilizó el reactivo (pNPP) (Sigma, Francia). Se cuantificaron las IgE, IgG1 e IgG2a específicas por comparación con las curvas de concentración-respuesta obtenidas con un ensayo de las IgE, IgG1 o IgG2a totales realizado en condiciones idénticas utilizando una fase sólida recubierta con un anticuerpo anti-ratón IgE, IgG o IgG2a (Serotec, Inglaterra) en lugar de proteínas de cacahuete, que es complementario a los trazadores. Los patrones de inmunoglobulina de ratón se obtuvieron de Serotec.

Ensayo de IgA

Se determinaron las IgA específicas en muestras de suero. Se incubaron sueros (1/50) diluidos en tampón PBS que contenía 0,1% de BSA en placas recubiertas con el PPE a 10 µg.mL⁻¹. Las IgA específicas se detectaron usando IgA anti-ratón de cabra (Southern Biotechnology Associated, EE.UU.) marcada con fosfatasa alcalina y se detectaron como anteriormente. Los resultados se presentan como unidades de absorbancia a 405 nm.

Producción de citoquinas

Después de la última toma de muestras de sangre, los ratones se sacrificaron por dislocación vertebral y se extrajeron los bazo en condiciones estériles. Se realizó un cultivo celular en presencia del PPE (2,5-250 µg.mL⁻¹), PBS (control negativo) o concanavalina A (1 µg.mL⁻¹, control positivo). Se analizaron IL-4, IL-5, IL-10, IFNγ y TGFβ utilizando kits CytoSet™ (BioSource International Europe, Bélgica) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)

Para provocar una respuesta de DTH, los ratones fueron inoculados después de la última inmunización oral por una inyección de 100 µg de proteínas de cacahuete en PBS en la almohadilla plantar trasera. Se inyectó PBS en la otra almohadilla plantar. Se midió el hinchazón neto de ambas almohadillas plantares utilizando un microcalibrador 24 h después de la inoculación y se compararon entre sí.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático Graph Pad (San Diego, EE.UU.). Los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA) y el ensayo de Dunnett para comparar los ratones tratados con los de control, o utilizando ANOVA y el ensayo de Tukey para comparar todos los grupos entre sí.

Resultados

Observaciones preliminares

La comprensión del sistema inmunológico en ratones y en seres humanos y el estudio de sus similitudes y diferencias en mecanismos tales como las respuestas Th1 y Th2 aún están en curso. Con el fin de evaluar el modelo que ha sido desarrollado como una prueba del concepto de inmunoterapia epicutánea, se proporcionan algunos elementos sobre los principales biomarcadores alérgicos y su interpretación en seres humanos y ratones, especialmente con relación al equilibrio Th1/Th2.

Desgranulación de mastocitos: en los seres humanos, la IgE es el único isotipo de inmunoglobulina que desencadena directamente la desgranulación de mastocitos y la posterior manifestación de anafilaxia, mientras que en los ratones, la desgranulación de mastocitos es desencadenada por IgG1 junto con IgE.

Producción de anticuerpos IgG: en los seres humanos, la producción de anticuerpos IgG, principalmente el subtipo IgG4, puede antagonizar y "bloquear" la cascada de inflamación alérgica resultante del reconocimiento de los antígenos por IgE. En los ratones, los anticuerpos equivalentes no están descritos y el cambio del perfil Th2 a Th1 consiste en el aumento del anticuerpo IgG2a.

En los seres humanos, la producción de IgE e IgG4 es estimulada en los linfocitos Th2, mientras que la producción de IgG1 e IgG3 es estimulada en los linfocitos Th1.

En los ratones, la producción de IgE e IgG1 es estimulada en los linfocitos Th2, mientras que la producción de IgG2a e IgG3 es estimulada en los linfocitos Th1.

En resumen, en el modelo de móridos, la eficacia de la inmunoterapia se evaluó esencialmente por el aumento de IgG2a específica.

1. Validación de la sensibilización

1.1 IgE, IgG1, IgG2a específicas durante la sensibilización

Se analizaron los anticuerpos específicos para el PPE inducidos en ratones BALB/c después de la administración de PPE por sonda nasogástrica. La sensibilización a los cacahuets en ratones se caracterizó por una producción de IgE y IgG1 específicas como se muestra en la figura 1. También se produjo IgG2a pero en menor medida que la IgG1 específica. En ratones sin tratamiento previo no pudieron detectarse anticuerpos específicos.

1.2 Citoquinas segregadas después de reactivación *in vitro* de esplenocitos

Esplenocitos de ratones sensibilizados con TC más PPE segregaron altas cantidades de alérgenos IL-4 e IL-5 específicos y pequeñas cantidades de IL-10, IFN γ y TGF β (figura 2). No se encontraron citoquinas en los ratones de control. Estos resultados demostraron que la respuesta Th2 específica al PPE fue inducida en ratones BALB/c que recibieron proteínas de cacahuete por medio de sonda nasogástrica.

1.3 Niveles de histamina después de inoculación oral

Debido a que el aumento de los niveles de histamina refleja la desgranulación de mastocitos y es uno de los principales mediadores de la reacción anafiláctica, la histamina se analizó en plasma después de la inoculación oral. La histamina fue detectable solamente en muestras de plasma de ratones sensibilizados (figura 3).

1.4 Hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)

Para completar los resultados previos que muestran la sensibilización de ratones a proteínas de cacahuete, se investigó la respuesta de DTH. Se realizó la inoculación en la almohadilla plantar al finalizar la sensibilización y se produjo una inflamación sólo en ratones sensibilizados (figura 4). No se encontró respuesta de DTH en la almohadilla plantar tratada con PBS.

2. Inmunoterapia para los cacahuets

2.1 Formulación para la inmunoterapia

El contenido de proteínas de la formulación utilizada para inmunoterapia se caracterizó por SDS-PAGE (figura 5).

2.2 IgE, IgG1, IgG2a específicas durante la inmunoterapia

IgE e IgG1: la sensibilización a los cacahuets se caracterizó particularmente por una producción de IgE e IgG1 específicas. Durante la inmunoterapia, se controló la evolución de anticuerpos específicos. Como se muestra en la figura 6, se estabilizó la producción de IgE específica durante 8 y 16 semanas de insensibilización. La disminución de IgE específica es un proceso a largo plazo que se puede observar sólo después de algunos meses. Además, durante la inmunoterapia, no se observó ninguna modificación de la IgG1 específica (datos no mostrados).

IgG2a: la IgG2a específica aumentó significativamente en ratones tratados después de 8 semanas y 16 semanas de insensibilización (figura 7).

Para confirmar la desviación inmunitaria desde un perfil Th2 dominante hasta un perfil Th2/Th1 equilibrado, se evaluó la relación IgG1/IgG2a para cada grupo: insensibilización por vía epicutánea (VE), no tratado (NT) y de control (figura 8). La relación IgG1/IgG2a disminuyó sólo en el caso de los ratones tratados que mostraron una potenciación del perfil Th1 con el fin de obtener un perfil Th2/Th1 más equilibrado.

2.3 Histamina

La histamina es uno de los principales mediadores de la reacción anafiláctica. La histamina se analizó en muestras de plasma recogidas 30 minutos después de inoculaciones orales como un marcador de la desgranulación de los mastocitos. Después de 16 semanas de insensibilización, se cuantificó la liberación de histamina en los ratones de cada grupo (tratados o no) (figura 9). Los ratones tratados por vía epicutánea con el PPE mostraron una liberación significativamente menor de histamina. Este resultado confirma una mejora del estado alérgico de los ratones.

2.4 IgA específica durante la inmunoterapia

La titulación de la IgA específica se realizó en muestras de suero después de 8 semanas de insensibilización (figura 10). La IgA específica aumentó significativamente en ratones tratados por vía epicutánea con el PPE después de 8 semanas de insensibilización. No se observó ninguna modificación en los ratones no tratados. La IgA específica no se detectó en los ratones de control.

Se describe que la IgA específica tiene una acción similar a la IgG4 durante la inmunoterapia. Su efecto inmunomodulador podría conducir a la producción de IL-10 y a la expresión de TGF β (Francis et al., 2008).

Conclusión

La vía epicutánea muestra un modo potente y original de insensibilización en ratones sensibilizados a los cacahuetes.

- 5 La insensibilización epicutánea condujo a una desviación inmunitaria desde un perfil Th2 dominante hasta un perfil Th2/Th1 reequilibrado y al aumento de la IgA específica. Como marcador de la alergenidad (desgranulación de los mastocitos), la liberación de histamina se redujo en ratones tratados por vía epicutánea.

Referencias

- Adel-Patient et al., Allergy, 2005, 60(5):658-64
- Becker et al., Int Arch Allergy Immunol, 2001, 124:100-2
- 10 Burks et al., J Allergy Clin Immunol, 1992, 90:962-9
- Burks et al., J Allergy Clin Immunol, 1991, 88:172-9
- Chatel et al., Int Arch Allergy Immunol, 2003, 131(1):14-8
- Francis et al., J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(5):1120-1125
- Hufnagl et al., Clin. Exp. Allergy, 2008 May 5
- 15 Koppelman et al., Allergy, 2001, 56:132-137
- Koppelman et al., Clin Exp Allergy, 2005, 35(4):490-7
- Lauer et al., Allergy, Volume 63, s88, Abstracts of the XXVII EAACI Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Barcelona, Spain on 7-11 June 2008, Page 158-611
- Pajno et al., J Allergy Clin Immunol. 2005 Dec, 116(6):1380-1
- 20 Mittag et al., J Allergy Clin Immunol, 2004, 114:1410-7
- Nelson et al., J Allergy Clin Immunol, 1997, 99:744-51
- Oppenheimer et al., J Allergy Clin Immunol, 1992, 90:256-62
- Rabjohn et al., J Clin Invest, 1999, 103:535-42
- Sicherer et al., J Allergy Clin Immunol, 2003, 112(6):1203-7
- 25 Skolnick et al., J Allergy Clin Immunol, 2001, 107(2):367-74

REIVINDICACIONES

1. Una composición de alérgenos de cacahuete para uso en el aumento de la tolerancia a los cacahuetes en un sujeto alérgico a los cacahuetes, en donde dicha composición comprende una o más proteínas seleccionadas de Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 o sus isoformas, sin adyuvante, y en donde dicha composición se administra repetidamente a dicho sujeto por vía epicutánea por medio de un dispositivo de parche para la piel que comprende un soporte, estando adaptada la periferia de dicho soporte para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada, en donde el parche comprende dicha composición en una dosis suficiente para inducir y controlar una reacción inflamatoria sobre la piel de dicho sujeto después de la aplicación del dispositivo de parche a la piel, conduciendo dicha administración, por repetición, a un aumento progresivo en el sujeto de la tolerancia a los cacahuetes.
2. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende un extracto de cacahuete o proteínas de cacahuete purificadas.
3. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dichas una o más proteínas están en forma seca.
4. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha una o más proteínas están en forma de partículas y unidas al soporte sin adhesivo, por medio de fuerzas electrostáticas y/o de Van der Waals.
5. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha una o más proteínas están en forma de partículas y unidas al soporte por medio de un recubrimiento adhesivo sobre el soporte.
6. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichas una o más proteínas se cargan en el soporte por medio de un proceso de secado por pulverización.
7. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dichas una o más proteínas están disueltas o dispersadas en un líquido.
8. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dichas una o más proteínas en forma líquida se mantienen sobre el soporte en un depósito de material adsorbente.
9. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la periferia del soporte tiene propiedades adhesivas.
10. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la aplicación del dispositivo de parche se repite al menos una vez a la semana, durante un período de 1 mes a varios años.
11. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la duración del contacto del parche con la piel para cada aplicación está comprendida entre 1-24 horas.
12. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el parche se aplica directamente a la piel, en una parte sin pelo del cuerpo, sin tratamiento previo de la piel.
13. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la aplicación del parche provoca un aumento en los niveles de la IgG específica.
14. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con la reivindicación 13, que provoca un aumento en los niveles de la IgG4 específica.
15. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la aplicación del parche provoca el aumento de una respuesta Th1 a las proteínas administradas.
16. La composición de alérgenos de cacahuete para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la aplicación del parche provoca una desviación inmunitaria desde un perfil Th2 dominante hasta un perfil Th1/Th2 más equilibrado.

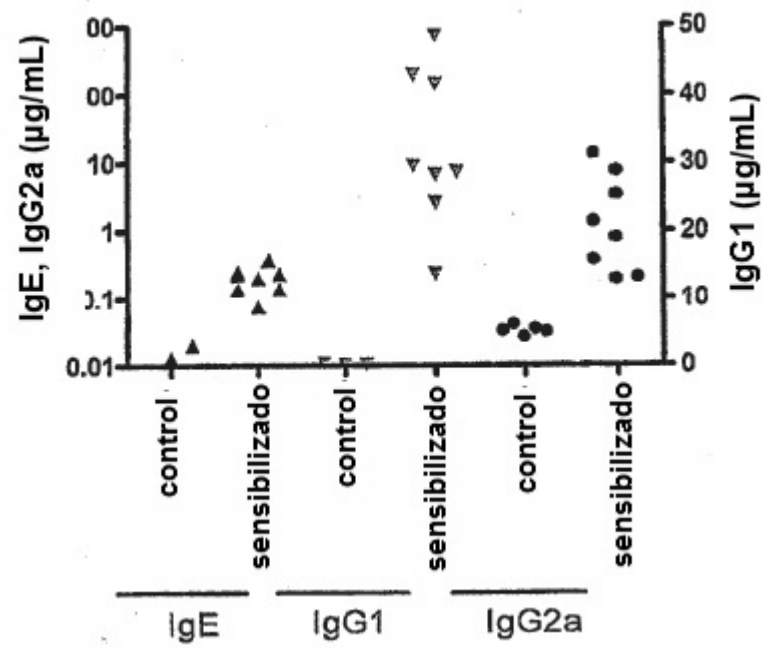


FIGURA 1

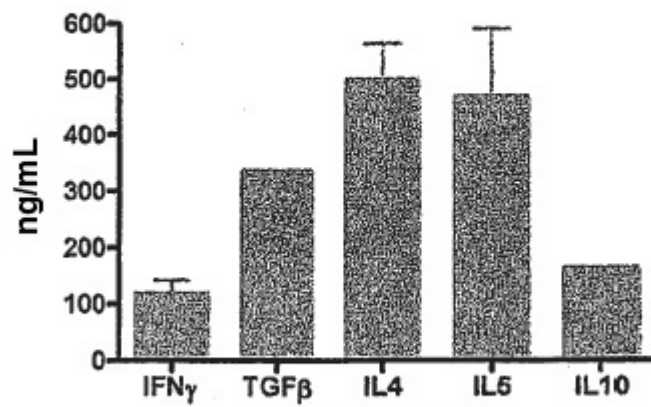


FIGURA 2

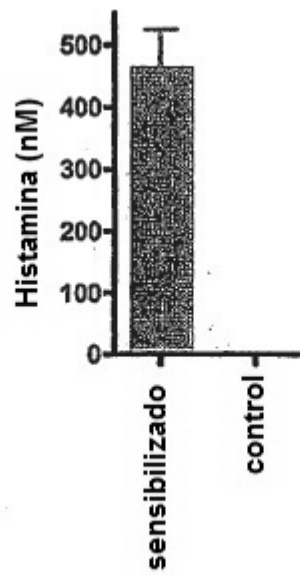


FIGURA 3

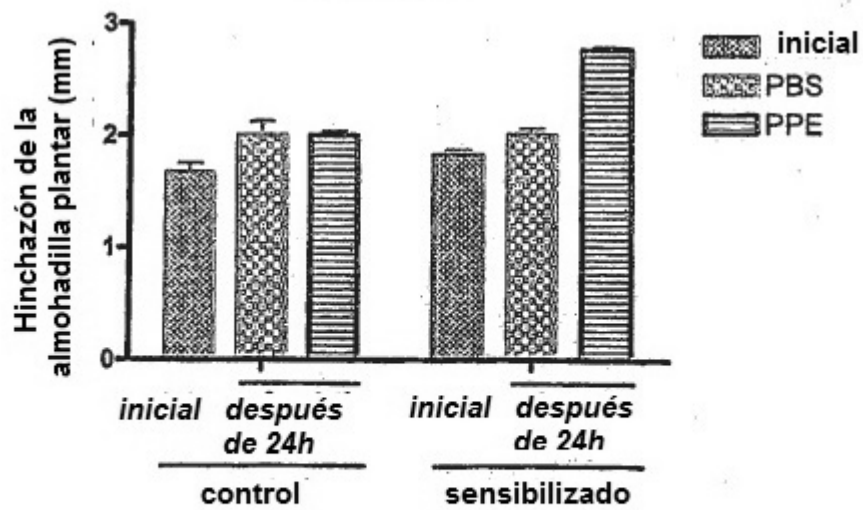


FIGURA 4

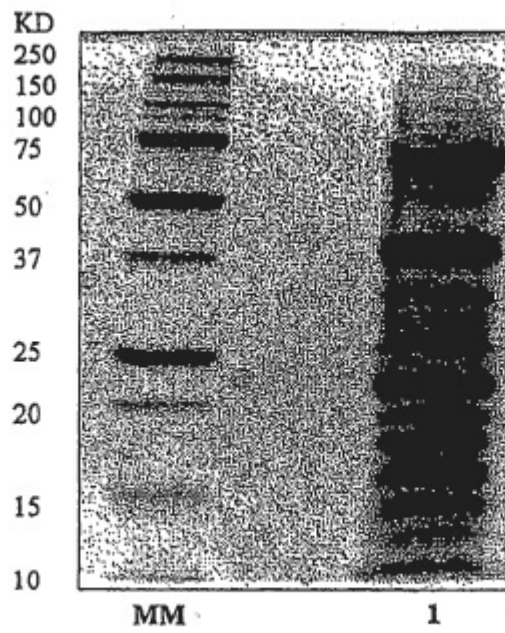


FIGURA 5

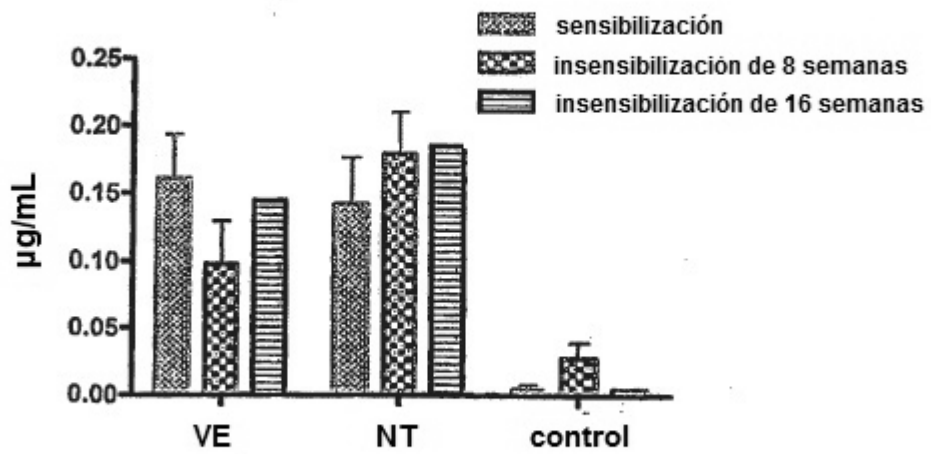


FIGURA 6

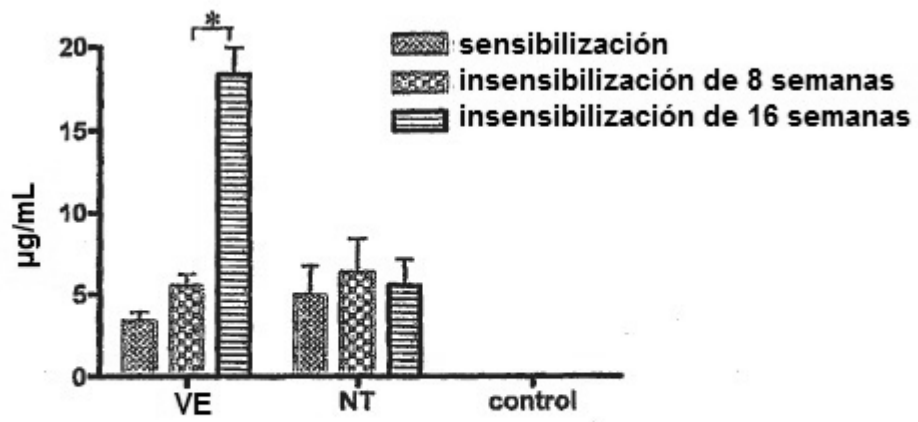


FIGURA 7

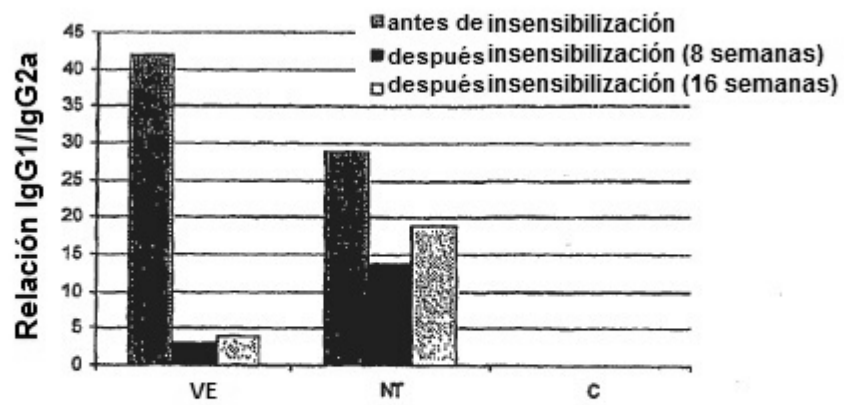


FIGURA 8

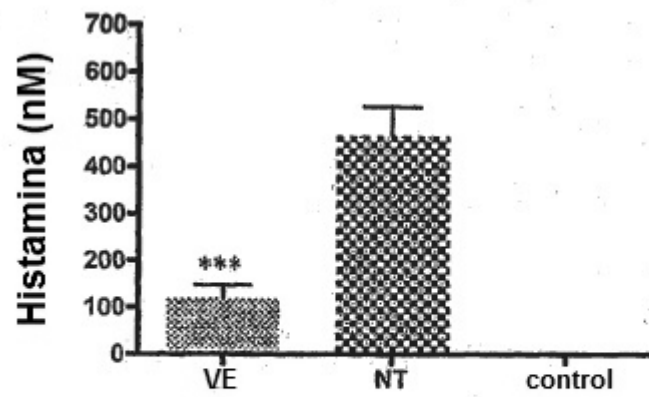


FIGURA 9

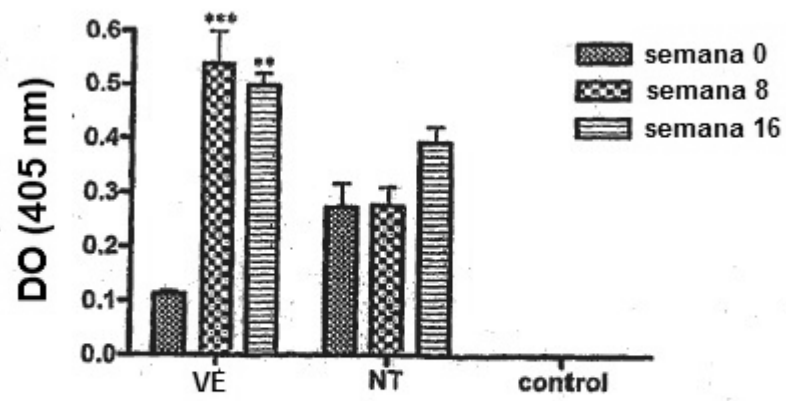


FIGURA 10