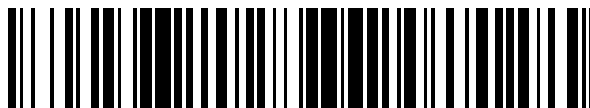


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 993**

21 Número de solicitud: 201531341

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

**C07K 16/16** (2006.01)

**C07K 17/08** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**21.09.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.04.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2016/070654**

71 Solicitantes:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (25.0%)**

**Avda. de la Constitucion, 18**

**41071 Sevilla ES;**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES**

**CIENTÍFICAS (25.0%);**

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID (25.0%)**

**y**

**UNIVERSITAT POMPEU FABRA (25.0%)**

72 Inventor/es:

**MAYORGA MAYORGA, Cristobalina ;**

**TORRES JAEN, María José;**

**BLANCA GÓMEZ, Miguel ;**

**ROJO MARCOS, Francisco Javier;**

**MASCARAQUE GONZÁLEZ, Ainhoa ;**

**RAMOS SORIANO, Francisco Javier;**

**FERNÁNDEZ PACIOS, Luis;**

**DÍAZ PERALES, Araceli ;**

**ANDREU MARTÍNEZ, David y**

**VALLE GARCÍA, Javier**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **Péptido para el tratamiento de la alergia**

57 Resumen:

Péptido para el tratamiento de la alergia.

La presente invención hace referencia a un péptido para el tratamiento de la alergia. Más específicamente una secuencia aminoacídica o peptídica (identificada en la presente invención como SEQ ID NO: 1) desarrollada a partir de varias regiones de la proteína Pru p 3. Adicionalmente, se refiere a un procedimiento para insertar dicha secuencia (SEQ ID NO: 1) en un sistema dendrítico. Dicho péptido de SEQ ID NO: 1 y complejo péptido-dendrímico proporcionan nuevas herramientas terapéuticas útiles, para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la alergia, concretamente de la alergia causada por el síndrome LTP.

ES 2 609 993 A1

## DESCRIPCIÓN

**Péptido para el tratamiento de la alergia****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la biología molecular, y se refiere al uso de un polinucleótido capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica o al uso de la propia secuencia aminoacídica en inmunoterapia, concretamente para el tratamiento de la alergia, preferiblemente alergia causada por el síndrome LTP (proteínas de transferencia de lípidos, las siglas LTP provienen del inglés: *Lipid Transfer Proteins*).

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La alergia a alimentos es un problema de salud pública que afecta al 4% de la población adulta en países occidentales y su prevalencia está en continuo aumento en los últimos años (Sicherer *et al.*, 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112(6):1203-1207; Sicherer SH. 2011. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127(3): 594-602; Liew *et al.*, 2009. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123(2): 434-442; Burks *et al.*, 2012. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129(4): 906-920), sin que se conozca de forma precisa cuáles son los factores que explican estas tendencias. Se estima que alrededor de un 25% de la población presentará algún tipo de reacción alérgica a lo largo de su vida, siendo la relativa a alimentos una de las que más contribuye a dicho porcentaje (Sariali *et al.*, 2012. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 98(2):151-158). Este tipo de alergia tiene efectos perjudiciales en la calidad de vida de los pacientes, en la economía familiar, en las relaciones interpersonales y en la salud, ya que puede derivar en síntomas de carácter grave que pueden comprometer la vida del paciente, fundamentalmente debido a la exposición a fuentes ocultas de alérgenos (Bollinger ME, Dahlquist LM, Mudd K, Sonntag C, Dillinger L, McKenna K. The impact of food allergy on the daily activities of children and their families. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2006;96(3): 415-421, 7). Ésta es una enfermedad compleja ya que a su desarrollo contribuyen múltiples factores genéticos, ambientales e incluso las condiciones de la exposición.

A pesar de la gran variedad de alimentos que inducen alergia, sólo una minoría de proteínas alimentarias son responsables de la sensibilización. En el área mediterránea, las reacciones alérgicas más frecuentes son las inducidas por alérgenos de origen vegetal, particularmente por proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLPT, del inglés *non-specific lipid transfer proteins*). Estas proteínas son panalérgenos que se caracterizan por estar

ampliamente distribuidas entre las diferentes especies vegetales, lo que hace que exista una alta reactividad cruzada entre frutas y pólenes. Pru p 3 es el alérgeno mayor en pacientes con alergia a melocotón en dicho área y la nsLTP responsable de manifestaciones clínicas en diferentes alergias a alimentos y pólenes. Estudios *in vitro* han demostrado que Pru p 3 es capaz de inducir la maduración de las células dendríticas (CD), dando lugar a una respuesta proliferativa específica con un patrón proinflamatorio en un 91% de los pacientes alérgicos al melocotón. Pru p 3 se caracteriza por contener 4 uniones disulfuro intramoleculares lo que le confiere una alta estabilidad a procesos térmicos y digestiones gastrointestinales, pudiendo contribuir al incremento de la inducción de reacciones graves y sistémicas. De hecho, se ha observado que modificaciones que reducen su estabilidad frente a la digestión, disminuyen también su capacidad alérgica.

Actualmente, el tratamiento de la alergia alimentaria consiste en evitar el alimento implicado tanto fresco como procesado (zumos, compotas, etc.). Sin embargo, esta medida es difícil de implementar debido al carácter ubicuo de estas proteínas. Las LTPs han sido identificadas prácticamente en todas las familias de vegetales, estando principalmente presentes en las partes aéreas de la planta como las hojas, pólenes y tallo. Estas proteínas se han asociado a sensibilizaciones múltiples con alimentos vegetales no relacionados taxonómicamente, dando un patrón complejo de manifestaciones clínicas normalmente severas (trastornos gastrointestinales y anafilaxia). El síndrome de las LTPs puede estar relacionado o no con rinitis estacional, lo que dificulta aún más su tratamiento. Además, aunque evitar su ingesta es actualmente el único tratamiento, es difícil de llevar a cabo debido a la severidad de las restricciones y al elevado peligro de contaminación alérgica.

Teniendo en cuenta todo esto, la inmunoterapia alérgeno-específica (sIT) parece ser el único tratamiento capaz de actuar modificando la historia natural, disminuyendo la respuesta efectora e induciendo así tolerancia inmunológica mediante la modulación de la respuesta alérgica Th2 hacia un patrón Th1 o regulador (Treg). Debido a la importancia que tienen las reacciones alérgicas a alimentos en general y a nsLTPs en particular, existe un interés en la comunidad científica por el desarrollo de sIT, por lo que se ha promovido un proyecto multicéntrico Europeo centrado en sIT con Pru p 3 (7FP EU). Los datos, hasta el momento, muestran unos resultados moderados probablemente debido a la aplicación de una dosis baja de proteína. Sin embargo, el incremento de la dosis, que aumentaría la respuesta inmunológica, también aumentaría la posibilidad de desarrollar reacciones alérgicas durante la sIT. Para aumentar el efecto inmunológico de la sIT sin riesgo de inducir reacciones existen diferentes aproximaciones.

Una de las aproximaciones es el uso de péptidos T de la proteína alergénica, Pru p 3 (T-Pru p 3) que son reconocidos por células T pero que no se unen a IgE específica. Una desventaja del uso de estos péptidos es que, al no ser una estructura proteica completa, pueden tener una capacidad inmunogénica menor y, por tanto, no inducir una respuesta inmune eficaz. Por ello, se plantea una sIT que supere esta limitación mediante dos abordajes: i) una presentación multivalente de un péptido derivado de la proteína alergénica del melocotón LTP (Pru p 3) que consiga un incremento de la densidad de epítomos presentados al sistema inmunológico; y ii) incluir en el tratamiento una molécula estimuladora del sistema inmunológico, en concreto ligandos de receptores tipo *Toll* (TLR) como por ejemplo el ADN CpG (ligando de TLR9). Con esta presentación se pretende activar el sistema inmune a través de células dendríticas y facilitar una protección frente a una respuesta alérgica, dirigiendo dicha respuesta hacia un patrón de tolerancia Th1 y/o regulador.

La utilización de un fragmento de la proteína en lugar de la proteína completa, que además no se une a anticuerpos IgE específicos de Pru p 3, minimiza el riesgo de inducción de una reacción alérgica durante el tratamiento. Además, posibilita una preparación sintética controlada y sencilla, accesible para su desarrollo en laboratorio.

Esta aproximación clínica permitirá la administración de una IT alérgeno-específica exenta de riesgo para los pacientes alérgicos a LTP, beneficiando tanto al paciente, como al sistema público sanitario ya que, en términos económicos, implicaría un gran ahorro de capital.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

Los autores de la presente invención han diseñado y han desarrollado la síntesis de una secuencia aminoacídica o peptídica (identificada en la presente invención como SEQ ID NO: 1) a partir de varias regiones de la proteína Pru p 3. Adicionalmente, los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento para insertar dicha secuencia (SEQ ID NO: 1) en un sistema dendrítico. Este hallazgo da lugar a nuevas herramientas terapéuticas útiles, lo cual proporciona una estructura para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la alergia, concretamente de la alergia causada por el síndrome LTP.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Esquema sintético del compuesto.

**Figura 2.** Cromatograma de HPLC (arriba) y MS (abajo) para la caracterización del péptido Prup3SH (Pru p 3). Otros datos en texto. En el espectro ESMS, los picos a 753,20 y 565,25 m/z corresponden a iones  $[M+3H]^{3+}$  y  $[M+4H]^{4+}$ , que dan lugar a la masa monoisotópica esperada 2255,1302 Da por deconvolución de las señales obtenidas.

**Figura 3.** Monitorización mediante HPLC de la reacción tiol-eno que conduce al compuesto 1, a tiempo 5 minutos. Picos correspondientes a Prup3SH (Pru p 3) ( $t_R = 2,98$  min), al compuesto 1 ( $t_R = 7,05$  min) y a una impureza ( $t_R = 7,33$  min). Elución con un gradiente lineal del 15 al 50% de B en A durante 15 min, a un caudal de 1 ml/min, con detección UV a 220 nm.

**Figura 4.** Cromatograma del compuesto 1 después de la purificación por HPLC. Elución con un gradiente lineal del 15 al 50% de B en A durante 15 min, a un caudal de 1 ml/min, con detección UV a 220 nm.

**Figura 5.** Esquema del procedimiento experimental de sensibilización con Pru p 3 e inmunoterapia con las diferentes combinaciones llevado a cabo en el modelo animal.

**Figura 6.** Medición de parámetros *in vivo* tras la provocación con Pru p 3. La aparición de síntomas de anafilaxis se evaluó en términos de disminución de la temperatura corporal después de 30-40 minutos tras la provocación.

**Figura 7.** Evolución de los niveles de anticuerpos IgE e IgG1 específicos a Pru p 3.

**Figura 8.** A) Respuesta proliferativa de esplenocitos CD4 en los diferentes grupos tras la provocación con Pru p 3. B) Producción de citoquinas durante la respuesta proliferativa.

**Figura 9.** Ensayo de toxicidad sobre el modelo de epitelio intestinal en monocapa celular Caco-2. (A) Evolución de la TEER durante 24 horas de incubación con el péptido SEQ ID NO 1 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Los valores de TEER corresponden a la media de todas las réplicas ( $n=3$ ). Se representan las medias y las SD (barras). (B) La integridad de las células Caco-2 se ha detectado por inmunohistoquímica con tinción con anticuerpos frente  $\alpha$  ocludina.

**Figura 10.** Ensayo de inmunoactividad del Péptido SEQ ID NO: 1 empleando células mononucleadas de sangre periféricas (PMBC) cultivadas con el Peptido SEQ ID NO 1 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0) durante 48 h en medio RPMI. En las últimas 16 horas se añadió  $[3H]$ -

timidina (0,5 µCi/pocillo) y se midió la proliferación como la radiactividad incorporada en un contador de centelleo. El índice de estimulación (SI) se calculó mediante la relación entre las cuentas (cpm) obtenidas en presencia del péptido SEQ ID NO: 1 y las cuentas obtenidas sin estímulo.

5

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### PÉPTIDO IMMUNOGÉNICO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han diseñado y han desarrollado la síntesis de una secuencia aminoacídica o peptídica (identificada en la presente invención como SEQ ID NO: 1) a partir de varias regiones de la proteína Pru p 3. Adicionalmente, los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento para insertar dicha secuencia (SEQ ID NO: 1) en un sistema dendrítico. Este hallazgo proporciona nuevas herramientas terapéuticas útiles para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la alergia, concretamente de la alergia causada por el síndrome LTP.

15 En el contexto de la presente invención la SEQ ID NO: 1 presenta la siguiente secuencia aminoacídica:

SEQ ID NO 1: H-Ala-Ser-Ser-Asn-Gly-Ile-Arg-Asn-Val-Asn-Asn-Leu-Ala-Arg-Thr-Pro-Asp-Arg-Gln-Ala-Cys-NH<sub>2</sub> (o también ASSNGIRNVNLLARTPDRQAC-amida en nomenclatura de una letra)

20 En el contexto de la presente invención nos referiremos indistintamente a dicha secuencia como SEQ ID NO: 1 o, secuencia o **fórmula (IX)**.

La SEQ ID NO: 1 es preferiblemente amida C-terminal.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a una secuencia aminoacídica, de ahora en adelante péptido de la invención, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos un 72%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 1.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido, preferiblemente de ADN o ARN, de ahora en adelante polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a un péptido de la invención (ver definición en el párrafo anterior) o que codifique para un péptido de la invención.

30

En la presente invención se entiende que los términos homología e identidad de secuencia tienen el mismo significado y son empleados indistintamente a lo largo de la presente descripción. Así, se entiende por "identidad" o "identidad de secuencia" al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST [Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3): 403-10]. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de The National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El experto en la materia entiende que cambios en la secuencia de nucleótidos de los genes que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son cambios evolutivamente neutros que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. En una realización particular, el tanto por ciento de identidad u homología corresponde al tanto por ciento de aminoácidos o nucleótidos comunes entre las dos secuencias con respecto al alineamiento global de la proteína, es decir, con respecto al alineamiento de la longitud completa de ambas secuencias.

En una realización más particular, el péptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 1.

Los péptidos de la presente invención, tal y como el representado por la fórmula (IX), pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una construcción genética, preferiblemente de ADN o ARN, de ahora en adelante construcción genética de la invención, que comprende al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:

a) una secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido de la invención, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*; o

5 b) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido de la invención, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

10 Un gran número de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia y forman parte de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, el término "vector" se entiende como un replicón, o un vector integrativo, al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

15 En el contexto de la presente invención, el término "replicón" se entiende como cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleotídica dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

En el contexto de la presente invención, el término "vector integrativo" se entiende como cualquier elemento genético que se integra y se mantiene estable en el genoma de una célula.

20 En el contexto de la presente invención, el término "secuencia de control" se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal y señales de terminación; en 25 eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

30 Como se usa aquí, el término "promotor" hace referencia a una región del ADN aguas arriba del punto de inicio de la transcripción, y en particular, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula vegetal, sea el origen del promotor una planta o no. Ejemplos de promotores



incluyen, pero no se limitan a, promotores obtenidos de plantas, virus de plantas, y bacterias que pueden expresar genes en células de plantas, como *Agrobacterium* o *Rhizobium*. Ejemplos de promotores bajo el control del desarrollo incluyen promotores que preferentemente inician la transcripción en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, o semillas. Tales promotores se denominan en esta memoria como preferentes de un tipo de tejidos. Hay otros promotores que inician la transcripción en un determinado tipo de tejidos, y se denominan como "tejido específicos". Un promotor "inducible" o "reprimible" es un promotor que se encuentra bajo el control del medio ambiente. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden afectar la transcripción son las condiciones anaeróbicas o la presencia de luz. Los promotores de tejido específico, tejido preferido, específicos de un tipo celular, o promotores inducibles son tipos que constituyen la clase de promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de las condiciones ambientales.

En el contexto de la presente invención, el término "unidos de forma operativa" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control "unida de forma operativa" a una secuencia que se transcribe a la secuencia nucleotídica de la invención, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

En el contexto de la presente invención, el término "secuencia codificadora" o "secuencia codificante" es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a ARNm y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, mRNA, cDNA y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

En el contexto de la presente invención, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN o RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN o DNA).

En el contexto de la presente invención, los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a anticuerpos o fragmentos biológicamente activos, de ahora en adelante anticuerpos o fragmentos biológicamente activos de la invención, capaces de unirse específicamente a un péptido de la invención, preferiblemente a la SEQ ID NO: 1. Estos anticuerpos o fragmentos biológicamente activos pueden ser producidos tras la inmunización de un animal con el péptido de la invención o mediante diversas tecnologías como la tecnología “phage display”.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el animal empleado para la inmunización es un mamífero.

10

#### COMPOSICIÓN DENDRÍMERA DE LA INVENCION

Una realización preferida de la invención se refiere a un péptido de la invención, preferiblemente a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, unida a un dendrón o dendrímero o a un sistema dendrimérico, de aquí en adelante compuesto péptido-dendrímero de la invención.

En esta memoria se entiende por dendrímero a una macromolécula tridimensional de construcción arborescente. Los dendrímeros son un grupo de polímeros con una estructura química precisa y los enlaces químicos entre los átomos pueden ser descritos con exactitud. Las macromoléculas dendriméricas presentan una forma de crecimiento generacional, G0, G1, G2, etc. El dendrímero está compuesto por unidades más pequeñas denominadas dendrones.

Entre las propiedades más importantes de los dendrímeros, junto con su polidispersidad cercana a 1, se encuentran las siguientes:

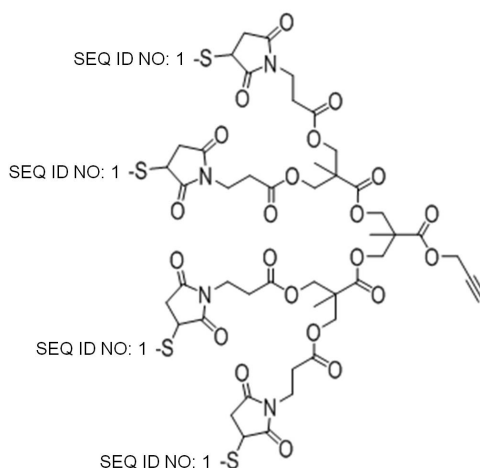
- a) Baja temperatura de transición vítrea.
- b) Baja viscosidad intrínseca.
- c) Alta solubilidad.
- d) Capacidad de formar sistemas tipo huésped-anfitrión.

Los dendrímeros tienen la propiedad de formar complejos huésped-anfitrión, donde la macromolécula dendrimérica es capaz de actuar como un sistema anfitrión que puede dar

cabida a diferentes moléculas en número y tamaño (Cruz-Morales, JA y Guadarrama, P, 2005 *Journal of Molecular structure* 779 (1),1-10).

Los métodos sintéticos para la preparación de dendrímeros se conocen como métodos iterativos de síntesis. Existen dos alternativas sintéticas: convergente y divergente. En el método convergente, el dendrímero se construye acoplando dendrones a un núcleo multifuncional. En el método divergente, el dendrímero se construye del núcleo hacia la periferia partiendo de un núcleo multifuncional mediante la conjugación de monómeros. En este último, el crecimiento está restringido a cierto límite de generaciones ya que, conforme aumenta el peso molecular, aumenta la funcionalidad en la periferia y, por lo tanto, la probabilidad de que se den imperfecciones en la estructura (funcionalización incompleta).

En una realización particular, el compuesto péptido-dendrímero comprende la fórmula (I):



10

Fórmula (I)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la presente invención definidos como compuestos péptido-dendrímero de la invención, tal y como los representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo *Z*, *E*), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

20

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA Y FORMA FARMACÉUTICA DE LA INVENCION

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende:

- 5 a) un péptido de la invención o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, y/o
- b) un polinucleótido de la invención, y/o
- c) una construcción genética de la invención, y/o
- 10 d) un compuesto péptido-dendrímico de la invención, y/o
- e) un anticuerpo de la invención.

En una realización preferida, la composición de la invención es una composición farmacéutica.

15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o preferiblemente excipientes y/o adyuvantes.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención además comprende otro principio activo.

20 Asimismo, dentro del alcance de la presente invención se encuentran los profármacos de las composiciones farmacéuticas de la invención. El término “prodroga” o “profármaco” tal y como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de la invención, tal y como un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitante: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo  
25 puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto, tal y como el compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica, siempre y cuando pueda ser administrado a un  
30 individuo y proporcione el compuesto en un compartimento biológico de un individuo. La

preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

5 Tal y como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que puedan ser utilizados en la elaboración de un medicamento o composiciones alimentarias, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

10 Cualquiera de los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal y como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto que puedan ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente  
15 aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en terapia como composiciones farmacéuticas, los compuestos de la invención, sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una  
20 forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tengan un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente  
25 superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

Por otro lado, hacemos notar que los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en las composiciones farmacéuticas de la invención son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente  
30 en la elaboración de composiciones terapéuticas.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos o principios activos adicionales para proporcionar una terapia de

combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea, o no, a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

- 5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la alergia es una vacuna.

El término "medicamento" o "composición farmacéutica", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. El término "medicamento" incluye,  
 10 por tanto, lo que se conoce como vacuna. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es enfermedad alérgica, más preferiblemente alergia al fruto del melocotón.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una  
 15 enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y que están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

20 La composición o composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes  
 25 activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica y/o conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes tales  
 30 como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio; deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

USOS MÉDICOS

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al uso de un péptido de la invención, de un compuesto péptido-dendrímico de la invención, de un polinucleótido de la invención, de una construcción genética de la invención o de una composición de la invención, en la  
 5 elaboración de un medicamento, o alternativamente, a un péptido de la invención, compuesto péptido-dendrímico de la invención, a un polinucleótido de la invención, a una construcción genética de la invención o a una composición o composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el uso de un péptido de la  
 10 invención, de un compuesto péptido-dendrímico de la invención, de un polinucleótido de la invención, de una construcción genética de la invención o de una composición o composición farmacéutica de la invención en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de una alergia generada por proteínas transportadoras de lípidos (LTPs) o (un) fragmento(s) de las mismas.

15 Preferiblemente, la alergia es generada por LTPs o (un) fragmento(s) de las mismas procedentes de material vegetal de la Familia *Rosaceae*, preferiblemente del género *Prunus*, aún más preferiblemente de la especie *Prunus pérsica* (melocotón o durazno).

Más preferiblemente, los individuos del género *Prunus* se seleccionan de la lista que consiste en: *Prunusaccumulans*, *Prunus africana*, *Prunus amplifolia*, *Prunus amygdaloides*,  
 20 *Prunus amygdalus*, *Prunus annularis*, *Prunus argentea*, *Prunus armeniaca*, *Prunus avium*, *Prunus besseyi*, *Prunus brachybotrya*, *Prunus brachypetala*, *Prunus brasiliensis*, *Prunus brittoniana*, *Prunus buxifolia*, *Prunus capollin*, *Prunus cerasifera*, *Prunus cerasus*, *Prunus cercocarpifolia*, *Prunus chamissoana*, *Prunus cornifolia*, *Prunus debilis*, *Prunus detrita*,  
 25 *Prunus divaricata*, *Prunus domestica*, *Prunus douglasii*, *Prunus emarginata*, *Prunus erythroxyton*, *Prunus espinozana*, *Prunus fasciculata*, *Prunus x ferganica*, *Prunus ferruginea*,  
*Prunus fortunensis*, *Prunus gentryi*, *Prunus galndulosa*, *Prunus guanaiensis*, *Prunus hainanensis*, *Prunus Havardii*, *Prunus herthae*, *Prunus hintonii*, *Prunus huatensis*, *Prunus sinsititia*, *Prunus integrifolia*, *Prunus lanata*, *Prunus laurocerasus*, *Prunus leiocarpa*, *Prunus lichoana*, *Prunus ligustrina*, *Prunus lundelliana*, *Prunus mexicana*, *Prunus microphylla*,  
 30 *Prunus moritziana*, *Prunus myrtifolia*, *Prunus nachichevanica*, *Prunus oblonga*, *Prunus oleifolia*, *Prunus omissa*, *Prunus opaca*, *Prunus ovalis*, *Prunus padifolia*, *Prunus pérsica*,  
*Prunus pleiantha*, *Prunus prunifolia*, *Prunus pumila*, *Prunus punctata*, *Prunus ravenii*, *Prunus rhamnoides*, *Prunus rotunda*, *Prunus rufa*, *Prunus ruiziana*, *Prunus salicina*, *Prunus samydoides*, *Prunus sellowii*, *Prunus serotina*, *Prunus simonii*, *Prunus skutchii*, *Prunus*



*spinosa*, *Prunus stipulata*, *Prunus subcoriacea*, *Prunus subcorymbosa*, *Prunus tetradenia*, *Prunus trichopetala*, *Prunus tucumanensis*, *Prunus ulei*, *Prunus urotaenia*, *Prunus ussuriensis*, *Prunus valida*, *Prunus virens*, *Prunus wurdackii*. Más preferiblemente, es un individuo de la especie *Prunus persica*.

- 5 La especie *Prunus pérsica* se clasifica dentro del Reino *Plantae*, División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Orden *Rosales*, Familia *Rosaceae*, Subfamilia *Amygdaloideae*, Tribu *Amygdaleae*, Género *Prunus*.

En esta memoria se entiende por "material vegetal" tanto las partes aéreas o subterráneas de plantas u otros materiales vegetales tales como jugos, resinas, aceites grasos, aceites  
10 esenciales y cualesquiera otras sustancias de esta naturaleza, como combinaciones de los mismos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales. Preferiblemente, el material vegetal es el fruto o preparado alimentario obtenido del fruto.

Después de la administración del péptido de la invención, en cualquiera de las formas descritas a lo largo de la presente memoria así como en su unión a dendrímeros, tal y como  
15 en la forma farmacéutica de una vacuna, el riesgo de reacciones alérgicas tales como shock anafiláctico se reduce sustancialmente. Esto se debe a que los péptidos de la invención son hipoalergénicos con reducida capacidad de unión a IgE pero con capacidad de estimular el sistema inmunológico modulando su respuesta, tanto la humoral como la celular, hacia un patrón regulador. El término "desensibilización" o inducción de tolerancia tal y como se usa  
20 en este documento significa la inmunoterapia específica de acuerdo con la presente invención.

La composición farmacéutica y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal,  
25 intraventricular, oral, sublingual, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, edad, peso, sexo, tolerancia, del mamífero en cuestión. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de principio activo que produzca el efecto  
30 deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos principios activos y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

El término "tratamiento" tal y como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en la presente invención la alergia alimentaria, que incluye:

- 5 (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

10 El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 20 EJEMPLOS DE LA INVENCION

### *Materiales y métodos.*

**Procedimientos generales.** Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN se registraron con espectrómetros Avance DPX 300 y DRX 400 Bruker (Bio-Spin, Rheinstetten, Alemania) y obteniéndose de disoluciones en  $\text{CDCl}_3$ . Todas las asignaciones se confirmaron mediante  
 25 experimentos de RMN bidimensionales. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  están en ppm relativos a la señal interna de TMS utilizando el método de la referencia indirecta del fabricante. Las señales se abrevian como: s, singlete; br s, singlete ancho; d, doblete; t, triplete; m, multiplete. Los espectros de masas se obtuvieron por ionización por electrospray en un espectrómetro Esquire 6000 Bruker Daltonics o por ionización FAB en un  
 30 espectrómetro Micromass Autospec-Q. Las TLC se realizaron en gel de sílice  $\text{HF}_{254}$  (Merck), con detección por luz UV revelando con el reactivo  $\text{KMnO}_4$  o con el reactivo Pancaldi

[(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>4</sub>, Ce (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O]. La gel de sílice 60 (Merck, 230 mesh) se utilizó para la cromatografía flash. La HPLC analítica se realizó en una columna C<sub>18</sub> 3µm (Phenomenex) 4.6x50mm. Los disolventes A y B fueron disoluciones 0,1% (v/v) de TFA en H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN, respectivamente. La elución se llevó a cabo empleando un gradiente lineal del 15 al 50% de B en A durante 15 min, a un caudal de 1 ml/min, con detección UV a 220 nm.

**Ácido isopropiliden-2,2-bis(hidroximetil)propiónico.** Se disolvieron en acetona (250 ml) ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (Bis-MPA, 50,00 g, 365,32 mmol), 2,2-dimetoxipropano (69 ml, 547,98 mmol) y ácido *p*-toluenosulfónico monohidrato (3,53 g, 18,27 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. Después de la neutralización del catalizador mediante la adición de una mezcla de solución de NH<sub>3</sub>/EtOH (5 ml, 1:1), el disolvente se evaporó. Después, el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 ml) y se lavó con H<sub>2</sub>O (2 × 60 ml). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para dar **2** (figura 1; 45,40 g, 71%) como cristales blancos. pf: 121-122°C, mp<sub>lit.</sub>: 122-123°C; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K, δ ppm, *J* Hz) 4,19 (d, 2H, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11,1, OCH<sub>2</sub>), 3,75-3,64 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,44 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>ipr</sub>), 1,41 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>ipr</sub>), 1,16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**2,2-Bis(hidroximetil)propionato de bencilo.** Se disolvieron en DMF (50 ml) bis-MPA (9,00 g, 65,76 mmol) y KOH (4,22 g, 75,24 mmol). La sal de potasio se dejó formar a 100 °C durante 1 h, después se añadió bromuro de bencilo (9,6 ml, 79,09 mmol). Después de 15 h de agitación a 100 °C, la DMF se eliminó por evaporación. El residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml) y se lavó con H<sub>2</sub>O (2 × 50 ml). El crudo de reacción se recrystalizó en hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, obteniéndose **3** (figura 1; 9,30 g, 63%) como cristales blancos. pf: 74-75°C; mp<sub>lit.</sub>: 75°C; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K, δ ppm, *J* Hz) 7,36 (m, 5H, H-Ar), 5,21 (s, 2H, CH<sub>2</sub> de Bn), 3,94 (d, 2H, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11,2, OCH<sub>2</sub>OH), 3,73 (d, 2H, OCH<sub>2</sub>OH), 2,88 (s, 2H, OH), 1,08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); MS (ESI) calc. para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> (m/z): 224,3; encontrado: 247,3 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Compuesto 4 (figura 1).** Ácido isopropiliden-2,2-bis(hidroximetil) propiónico **2** (4,00 g, 23,00 mmol), 2,2-bis(hidroximetil)propionato de bencilo **3** (figura 1; 2,46 g, 11,00 mmol) y DPTS (1,29 g, 4,40 mmol) se mezclaron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (30 ml). El matraz de reacción se purgó con argón y se añadió DCC (5,67 g, 27,50 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (10 ml). La agitación a temperatura ambiente se continuó durante 15 h bajo atmósfera de argón. Una vez completada la reacción, el disolvente se evaporó y el crudo de reacción se disolvió en AcOEt. A continuación, la dicitclohexilurea resultante se filtró con algodón y se lavó con un pequeño volumen de AcOEt. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt/hexano, 3:2) para dar **4** (figura 1; 4,99 g, 85%) como un aceite viscoso incoloro. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K, δ ppm, *J* Hz) 7,34-7,29 (m, 5H, H-Ar), 5,14 (s, 2H,

CH<sub>2</sub> de Bn), 4,34-4,12 (m, 4H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>), 4,09 (d, 4H, <sup>2</sup>J<sub>H<sub>b</sub>,H<sub>b</sub> = 7,4, OCH<sub>b</sub>H<sub>b</sub>), 3,56 (d, 4H, OCH<sub>b</sub>H<sub>b</sub>), 1,40 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>ipr</sub>), 1,34 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>ipr</sub>), 1,30 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>a</sub>), 1,09 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>b</sub>); MS (ESI) calc. para C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>10</sub> (m/z): 536,6; encontrado: 559,6 [M+Na]<sup>+</sup>.</sub>

**Compuesto 5 (figura 1).** A una disolución del compuesto **3** (figura 1; 612 mg, 1,14 mmol) en AcOEt (5 ml), se añadió catalizador de Pd(C). El reactor para la hidrogenólisis catalítica se llenó con H<sub>2</sub> (4 Bar) y se agitó durante la noche. Después de este tiempo, el catalizador se separó por filtración utilizando celita y se lavó cuidadosamente con AcOEt. El disolvente del filtrado se evaporó para dar el ácido **5** (figura 1; 458 mg, 90%) como un aceite viscoso incoloro. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K, δ ppm, J Hz) 6,57 (br s, 1H, COOH), 4,40-4,27 (m, 4H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>), 4,16 (d, 4H, <sup>2</sup>J<sub>H<sub>b</sub>,H<sub>b</sub> = 7,4, OCH<sub>b</sub>H<sub>b</sub>), 3,63 (d, 4H, OCH<sub>b</sub>H<sub>b</sub>), 1,41 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>ipr</sub>), 1,36 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>ipr</sub>), 1,30 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>a</sub>), 1,14 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>b</sub>); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K, δ ppm) 177,3, 173,5 (CO), 98,3 (C<sub>ipr</sub>), 65,9 (OC<sub>b</sub>H<sub>2</sub>), 65,1 (OCaH<sub>2</sub>), 46,5 (C<sub>q,a</sub>), 42,0 (C<sub>q, b</sub>), 24,9 (C<sub>ipr</sub>H<sub>3</sub>), 22,3 (C<sub>ipr</sub>H<sub>3</sub>), 18,5 (C<sub>b</sub>H<sub>3</sub>), 17,7 (C<sub>a</sub>H<sub>3</sub>); MS (ESI) calc. para C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub> (m / z): 446,5; encontrado: 469,5 [M+Na]<sup>+</sup>.</sub>

**Compuesto 6 (figura 1).** El ácido **5** (figura 1; 848 mg, 1,90 mmol), el alcohol propargílico (0,3 ml, 5,70 mmol) y DPTS (558 mg, 1,90 mmol) se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) bajo atmósfera de Ar. A continuación, una disolución de DCC (1,18 g, 5,70 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) se añadió y la mezcla de reacción se agitó a 40°C durante 24 h en atmósfera de Ar. Una vez que se completó la reacción, el exceso de dicitclohexilurea se filtró, lavando con un pequeño volumen de AcOEt. El crudo de reacción se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/hexano, 1:4) para dar **6** (figura 1; 755 mg, 82%) como cristales blancos. R<sub>f</sub> = 0,60 (hexano/AcOEt, 2:1); pf: 87-88°C; <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K, δ ppm, J Hz) 4,72 (d, 2H, <sup>4</sup>J<sub>H,CCH</sub> = 2,5, OCH<sub>2</sub>CCH), 4,33 (s, 4H, O (CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>), 4,16 (d, 4H, <sup>2</sup>J<sub>H<sub>b</sub>,H<sub>b</sub> = 11,1, OCH<sub>b</sub>H<sub>b</sub>), 3,62 (d, 4H, OCH<sub>b</sub>H<sub>b</sub>), 2,47 (t, 1H, CCH), 1,42 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>ipr</sub>), 1,36 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>ipr</sub>), 1,32 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>a</sub>), 1,16 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>b</sub>); <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K, δ ppm) 173,5, 171,8 (CO), 101,4 (C<sub>ipr</sub>), 77,2 (CCH), 75,3 (CCH), 66,0 (OC<sub>b</sub>H<sub>2</sub>), 65,3 (OCaH<sub>2</sub>), 52,7 (OCH<sub>2</sub>CCH), 46,8 (C<sub>q, a</sub>), 42,0 (C<sub>q,b</sub>), 25,0 (C<sub>ipr</sub>H<sub>3</sub>), 22,2 (C<sub>ipr</sub>H<sub>3</sub>), 18,5 (C<sub>b</sub>H<sub>3</sub>), 17,6 (C<sub>a</sub>H<sub>3</sub>); MS (ESI) calc. para C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>10</sub> (m / z): 484,5; encontrado: 485,3 [M+H]<sup>+</sup>; HR-MS (FAB), calc. para C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>10</sub>Na (m / z): 507,2206; encontrado: 507,2211 [M+Na]<sup>+</sup>.</sub>

**Compuesto 7 (figura 1).** Se añadió resina DOWEX 50W-X8 activada (2,80 g) a una disolución de **6** (figura 1; 641 mg, 1,32 mmol) en MeOH (12 ml). La mezcla se agitó a 40 °C hasta la desaparición completa del material de partida. La resina se separó por filtración y el filtrado se concentró y se secó bajo alto vacío para dar **7** (500 mg, 94%) como cristales blancos. R<sub>f</sub> = 0,18 (hexano/AcOEt, 1:1); mp: 102-103°C; <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K, δ

ppm,  $J$  Hz) 4,72 (d, 2H,  $^4J_{H,CCH} = 2,5$ ,  $OCH_2CCH$ ), 4,25 (s, 4H, O  $(CH_2)_a$ ), 3,71-3,59 (m, 8H, O  $(CH_2)_b$ ), 2,47 (t, 1H, CCH), 1,32 (s, 3H,  $(CH_3)_a$ ), 1,16 (s, 6H,  $(CH_3)_b$ );  $^{13}C$ -RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ , 298K,  $\delta$  ppm) 175,1, 172,2 (CO), 77,2 (CCH), 75,5 (CCH), 67,9 ( $OC_bH_2$ ), 64,71 ( $OC_aH_2$ ), 52,8 ( $OCH_2CCH$ ), 49,7 ( $C_{q,b}$ ), 46,4 ( $C_{q,a}$ ), 18,0 ( $C_bH_3$ ), 17,1 ( $C_aH_3$ ); MS (ESI), calc. para  $C_{18}H_{28}O_{10}$  (m/z): 404,4; encontrado: 405,1  $[M+H]^+$ ; HR-MS (FAB), calc. para  $C_{18}H_{28}O_{10}Na$  (m/z): 427,1580; encontrado: 427,1581  $[M+Na]^+$ .

**Dendrón de maleimida 8 (figura 1).** A una disolución de tetrol 7 (200 mg, 0,49 mmol), se añadió ácido 3-maleimidopropiónico (502 mg, 2,97 mmol) y DPTS (292 mg, 0,99 mmol) en  $CH_2Cl_2$  seco (6 ml) bajo atmósfera de Ar. Posteriormente se añadió una disolución de DCC (781 mg, 2,97 mmol) en  $CH_2Cl_2$  seco (4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Una vez que se completó la reacción, el exceso de diciclohexilurea se filtró, lavando con un pequeño volumen de  $CH_2Cl_2$ . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ( $CH_2Cl_2/MeOH$ , 98: 2) para dar 8 (figura 1; 426 mg, 86%) como un aceite viscoso incoloro.  $R_f = 0,28$  (AcOEt / $CH_2Cl_2$ , 1: 2);  $^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ , 298K,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz) 6,69 (s, 8H,  $H_{maleimida}$ ), 4,69 (d, 2H,  $^4J_{H,CCH} = 2,5$ ,  $OCH_2CCH$ ), 4,25 (d, 2H,  $^2J_{Ha,Ha} = 11,1$ ,  $OCH_aH_a$ ), 4,20 (d, 2H,  $OCH_aH_a$ ), 4,17 (d, 4H,  $^2J_{Hb,Hb} = 11,1$ ,  $OCH_bH_b$ ), 4,12 (d, 4H,  $OCH_bH_b$ ), 3,77 (t, 8H,  $^3J_{H,H} = 7,0$ ,  $NCH_2CH_2$ ), 2,62 (t, 8H,  $NCH_2CH_2$ ), 2,52 (t, 1H, CCH), 1,25 (s, 3H,  $(CH_3)_a$ ), 1,20 (s, 6H,  $(CH_3)_b$ );  $^{13}C$ -RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ , 298K,  $\delta$  ppm) 171,9, 171,5, 170,4, 170,3 (CO), 134,3 ( $CH_{maleimida}$ ), 77,4 (CCH), 75,8 (CCH), 65,7 ( $OC_aH_2$ ), 65,4 ( $OC_bH_2$ ), 52,9 ( $OCH_2CCH$ ), 46,7 ( $C_{q,a}$ ), 46,2 ( $C_{q,b}$ ), 33,6 ( $NCH_2CH_2$ ), 32,8 ( $NCH_2CH_2$ ), 17,9 ( $C_bH_3$ ), 17,5 ( $C_aH_3$ ); MS (ESI), calc. para  $C_{46}H_{48}N_4O_{22}$  (m/z): 1.008,3; encontrado: 1009,3  $[M+H]^+$ ; HR-MS (ESI), calc. Para  $C_{46}H_{48}N_4O_{22}$  (m/z): 1008,2760; encontrado: 1009,2805  $[M+H]^+$ , 1026,3086  $[M+NH_4]^+$ , 1031,2637  $[M+Na]^+$ , 1047,2377  $[M+K]^+$ .

**Péptido ASSNGIRNVNLLARTPDRQAC-amida (Prup3SH)** (Pru p 3). La síntesis en fase sólida se realizó sobre 0,125 g de resina Fmoc-Rink-amida MBHA (Iris Biotech, Marktredwitz, Alemania) de 0,4 mmol/g de sustitución (escala 50  $\mu$ mol). Los residuos se incorporaron sucesivamente, en forma de los correspondientes derivados Fmoc (Iris Biotech), en sentido C a N-terminal, en un sintetizador Prelude (*Protein Technologies, Tucson, AZ*) empleando protocolos estándar de química Fmoc (Fields et al., 1990. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 35 (3), 161-214). Las cadenas laterales se protegieron con grupos terc-butilo (Asp, Ser, Thr), NG-2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Arg), y tritilo (Asn, Cys, Gln). Para cada etapa de acoplamiento se utilizaron 8 equivalentes de cada Fmoc-L-amino ácido y de hexafluoroborato de 2- (1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-

tetrametiluronio (HBTU), en presencia de 16 equivalentes de *N,N*-diisopropiletilamina, en DMF como disolvente. Después del ensamblaje de la secuencia del péptido, la desprotección de las cadenas laterales y el desanclaje se llevaron a cabo con CF<sub>3</sub>COOH / H<sub>2</sub>O / triisopropilsilano (95: 2,5: 2,5 v/v, 90 min, RT). El péptido se precipitó por adición de éter dietílico frío, se recogió en AcOH acuoso (0,1 M) y se liofilizó. La HPLC analítica de fase reversa se realizó en una columna Luna C18 (4,6 x 50 mm, 3 μm; Phenomenex, Jupiter, CA), empleando gradientes lineales de disolvente B (0,036% TFA en CH<sub>3</sub>CN) en A (0,045% TFA en H<sub>2</sub>O) para la elución, a un flujo de 1 ml/min, con detección UV a 220 nm. La purificación por HPLC preparativo se llevó a cabo en una columna Luna C18 (21,2 x 250 mm, 10 μm; Phenomenex, Jupiter, CA), utilizando gradientes lineales de disolvente B (0,1% TFA en CH<sub>3</sub>CN) en A (0,1% TFA en H<sub>2</sub>O), a un flujo de 25 mL/min (Fig. 1). Las fracciones de HPLC con una adecuada homogeneidad y con la masa esperada se combinaron y se liofilizaron para dar ~ 21 mg (9,3 μmol, 19% de rendimiento global) del péptido diana como un polvo blanco esponjoso, caracterizado satisfactoriamente en un instrumento LC-MS 2010EV (Shimadzu) equipado con una columna XBridge C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 μm, Waters, Cerdanyola del Vallès, España) eluida con gradientes lineales de HCOOH / CH<sub>3</sub>CN (0,08%, v/v) en HCOOH / H<sub>2</sub>O (0,1%, v/v) durante 15 min a 1 ml/min.

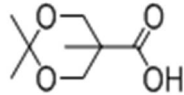
**Compuesto 1 (figura 1).** A una disolución del dendrón de maleimida **8** (202 μg, 0,2 μmol) en CH<sub>3</sub>CN (170 μl) se añadió una disolución de Prup3SH (2,4 mg, 0,96 mmol) en tampón fosfato 50 mM a pH 7,4 (340 μl). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación orbital a temperatura ambiente. El progreso de la reacción fue monitorizado mediante HPLC analítica (Fig. 2). A los 5 minutos de reacción, se observó la reacción total de los grupos maleimida del dendrón **8** (figura 1), detectándose el producto final a un tiempo de retención de 7,05 min. con un porcentaje de conversión prácticamente cuantitativo. El producto de reacción se purificó mediante RP-HPLC semipreparativa para dar el compuesto tetravalente **1** (1,475 g, 44%) como un sólido blanco. Como condiciones para el seguimiento o purificación por HPLC se emplearon una columna Phenomenex C<sub>18</sub> (3 μm y 4,6x50 mm ó 10 μm y 10x250 mm, para el HPLC analítico y semipreparativo, respectivamente) y un gradiente lineal del 15 al 50% de B (0,1 % TFA en CH<sub>3</sub>CN) en A (01% TFA en H<sub>2</sub>O) durante 15 min, a un caudal de 1 ml/min ó 3 ml/min (analítico y semipreparativo, respectivamente), con detección a 220 nm. HR-MS (ESI), calc. para C<sub>46</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>22</sub> (*m/z*): 10034,8640; encontrado: 10035,02 [M + H]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 1. PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE EL COMPUESTO DE FORMULA I (COMPUESTO 1 FIGURA 1)**

Para la obtención de un compuesto de fórmula (I), se pueden llevar a cabo los siguientes pasos:

a) obtener un compuesto de fórmula (II) a partir del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA):

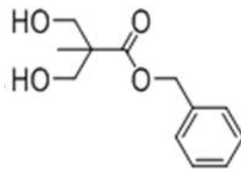
5



Fórmula (II)

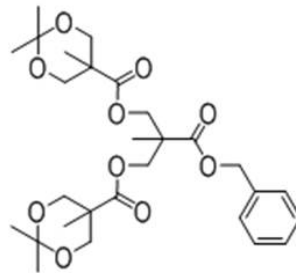
b) obtener un compuesto de fórmula (III) a partir del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA):

10



Fórmula (III)

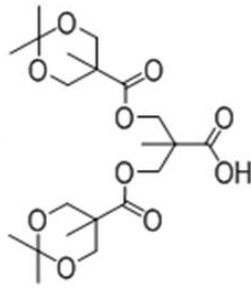
c) obtener un compuesto de fórmula (IV) uniendo el compuesto de fórmula (II) del paso a) al de fórmula (III) del paso b):



Fórmula (IV)

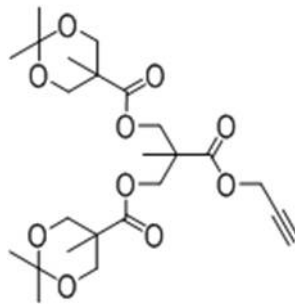
15

d) obtener un compuesto de fórmula (V) a partir del compuesto de fórmula (IV) del paso c):



Fórmula (V)

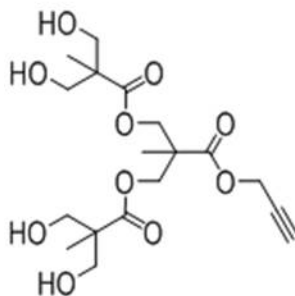
e) obtener un compuesto de fórmula (VI) a partir del compuesto de fórmula (V) del paso d):



5

Fórmula (VI)

f) obtener un compuesto de fórmula (VII) a partir del compuesto de formula (VI) del paso e):

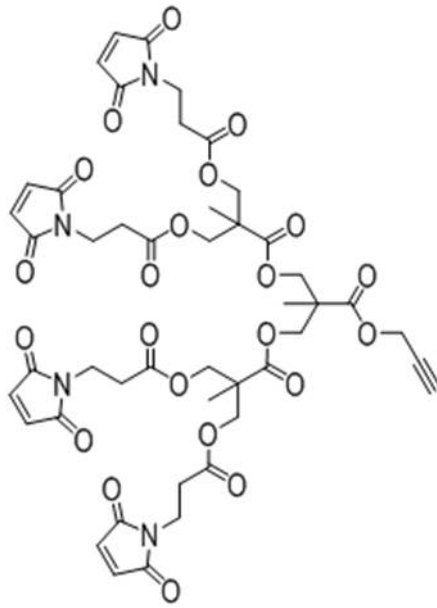


10

Fórmula (VII)

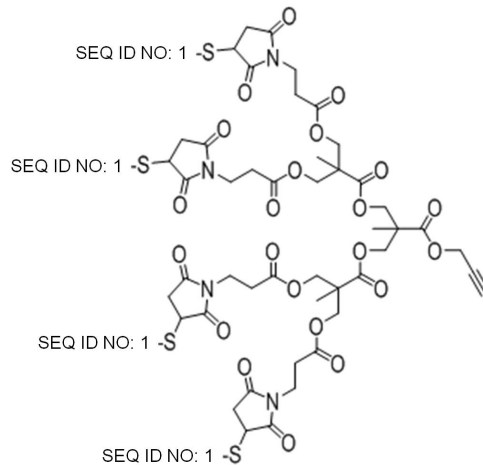
g) obtener un compuesto de fórmula (VIII) a partir del compuesto de formula (VII) del paso f):





Fórmula (VIII)

h) obtener un compuesto de fórmula (I) a partir del compuesto de fórmula (VIII) del paso g):



Fórmula (I)

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (II) del paso a) se obtiene mediante protección del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA).

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (III) del paso b) se obtiene añadiendo hidróxido potásico y bromuro de bencilo al ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA).

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (IV) del paso c) se obtiene por esterificación del compuesto de fórmula (II) del paso b) con el compuesto de fórmula (III) del paso c).

Preferiblemente, se utilizan como catalizadores de la reacción de esterificación la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y el *p*-tolueno sulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio (DPTS).

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (V) del paso d) se obtiene por hidrogenación catalítica del compuesto de fórmula (IV) del paso c).

- 5 Preferiblemente, el compuesto de fórmula (VI) del paso e) se obtiene haciendo reaccionar con alcohol propargílico al compuesto de fórmula (V) del paso d).

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (VII) del paso f) se obtiene mediante transesterificación del grupo isopropilideno del compuesto de fórmula (VI) del paso e).

- 10 Preferiblemente, el compuesto de fórmula (VIII) del paso g) se obtiene uniendo ácido 3-maleimido propiónico al compuesto de fórmula (VII) del paso f). Preferiblemente, se utilizan como catalizadores de la reacción de esterificación la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y el *p*-tolueno sulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio (DPTS).

- 15 Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) del paso h) se obtiene añadiendo al menos una secuencia SEQ ID NO: 1 por grupo maleimida del compuesto de fórmula (VIII) g). Esto último, se podría combinar con otras secuencias (péptidos), también sería factible tener compuestos con un número menor o mayor de péptidos usando estructuras de maleimidias similares. Preferiblemente, la SEQ ID NO: 1 añadida comprende además un grupo tiol (SH).

## 20 **Ejemplo 2. Modelo experimental de inmunoterapia con la estructura dendrímica multivalente**

- 25 El dendrón maleimida **8** (en figura 1), intermedio clave para obtener el compuesto final **1** (en figura 1, también denominado compuesto de Formula I), ha sido preparado como se describe en (Kowalczyk *et al.*, 2012. *Eur. J. Org. Chem.* 4565-4573), utilizando un enfoque decrecimiento divergente como se representa en la figura 1, a partir del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA) disponible comercialmente.

- 30 En primer lugar, la protección del 1,3-diol del bis-MPA se llevó a cabo en condiciones ácidas para dar el acetónido correspondiente **2** (en figura 1; Ihre *et al.*, 1998. *Macromolecules* 31 (13), 4061-4068). Por otra parte, el éster bencílico del bis-MPA **3** (en figura 1; Ihre *et al.*, 1998. *Macromolecules* 31 (13), 4061-4068) se preparó mediante tratamiento con hidróxido de potasio y bromuro de bencilo. La esterificación de doble etapa del compuesto acetónido protegido **2** (en figura 1) y la derivado bencilado **3** (en figura 1) se llevó a cabo con un buen

rendimiento utilizando *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *p*-tolueno sulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio (DPTS) como catalizador. La hidrogenación catalítica del compuesto **4** (en figura 1; Ihre *et al.*, 1998. *Macromolecules* 31(13), 4061-4068) dio lugar a **5** (en figura 1; Ihre *et al.*, 1998. *Macromolecules* 31(13), 4061-4068) con un excelente rendimiento. A

5 continuación, el grupo ácido se acopló con alcohol propargílico para obtener el compuesto **6** (en figura 1; Kowalczyk *et al.*, 2012. *Eur. J. Org. Chem.* 4565-4573) de acuerdo con el procedimiento general para la preparación de ésteres (mencionado anteriormente). La transesterificación de los grupos protectores isopropilideno en condiciones suaves dio lugar al

10 compuesto **7** (en figura 1; Kowalczyk *et al.*, 2012. *Eur. J. Org. Chem.* 4565-4573) con buen rendimiento después de la eliminación de la resina de intercambio iónico por filtración. El acoplamiento del tetrol **7** (en figura 1) con el ácido 3-maleimidopropiónico utilizando DCC como agente condensante y DPTS como catalizador, condujo a la formación del compuesto **8** (en figura 1) con buenos rendimientos tras purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice.

15 La secuencia del péptido ASSNGIRNVNLLARTPDRQAC-amida (Prup3SH) fue sintetizado en una resina de amida de Rink por procedimientos de síntesis en fase sólida Fmoc. Posteriormente, se desprotegeron las cadenas laterales y se desancló de la resina, purificando por HPLC de fase reversa y caracterizando por espectrometría de masas. A

20 continuación, el péptido puro se conjugó quimio-selectivamente con el dendrón maleimida **8** (en figura 1) utilizando la química tiol-eno, con una conversión completa. La monitorización por HPLC de la conjugación mostró que la reacción se completaba en aproximadamente 5 min. Tras purificación por HPLC semipreparativa de la mezcla de reacción se obtuvo el sistema tetravalente **1** (en figura 1) en forma homogénea (> 99% HPLC).

25 Para llevar a cabo el modelo experimental de inmunoterapia con la estructura dendrimerica multivalente de Formula I, se sensibilizaron 5 grupos de ratones con Pru p 3 y LPS inoculados por vía nasal durante 6 semanas para producir ratones anafilácticos frente a Pru p 3 dejando un grupo de ratones sin tratar. Tras estas 6 sensibilizaciones, se comenzó la inmunoterapia (IT) según el grupo de ratones (Figura 5).

- 30 Grupo 2: no recibieron IT  
 Grupo 3: IT con Dendrón-Pru p 3 y CpG  
 Grupo 4: IT con CpG  
 Grupo 5: IT con Dendrón- Pru p 3  
 Grupo 6: IT con Pru p 3

Tras 8 semanas de tratamiento se realizó una provocación con Pru p 3 (100 microgramos). Tras 30-40 minutos se midió la temperatura, se extrajeron sangre y las células del bazo para las posteriores determinaciones *in vitro*.

5 La medición de la temperatura tras la provocación indicó una bajada de la misma sólo en el grupo 2, que fueron sensibilizados pero no recibieron inmunoterapia, que seguían siendo anafilácticos. También sufrieron anafilaxia aquellos ratones tratados directamente con Pru p 3 (Grupo 6). Por el contrario, los ratones tratados con el dendrón-Pru p 3 no desarrollaron anafilaxia independientemente de la presencia de CpG (Figura 6).

10 Los ratones anafilácticos no tratados con inmunoterapia mostraron niveles elevados de IgE y de IgG1 (ambos de un patrón Th2) específicos de Pru p 3. Por otro lado, los ratones tratados con IT tienen unos valores de IgE específica a Pru p 3 bajos, similares a los no anafilácticos, Sin embargo, mantienen elevados los valores de IgG1 indicando que existe una sensibilización a Pru p 3 (Figura 7).

15 Los resultados a nivel celular indican una respuesta proliferativa significativamente más elevada en los ratones anafilácticos y esta diferencia sólo fue observada respecto a los ratones con inmunoterapia con Dendrón-Pru p 3 y CpG. El análisis de la producción de citoquinas indica una leve disminución de IL4 (patrón Th2) y un aumento de IFN $\gamma$  (Patrón Th1) y de IL10 (reguladoras) en los ratones que recibieron una inmunoterapia con Dendrón-Pru p 3 y CpG (Figura 8).

### 20 **Ejemplo 3. Ensayos de toxicidad**

Para estudiar la toxicidad del dendrimero de fórmula I, se empleó la línea celular estable Caco-2 (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.), modelo de monocapa de epitelio intestinal. Las células fueron sembradas en medio RPMI en placas de cultivo de 24 pocillos sobre Transwell (0,4 mm de diámetro de poro; Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.) a una densidad  
25 de 105 células por pocillo. Se cultivaron durante 18-21 días, reemplazando el medio cada 2 días. La integridad de la monocapa de células Caco-2 se comprobó mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) usando un dispositivo de Millicell-ERS (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.), hasta alcanzar valores de TEER superior a 300  $\Omega$ cm<sup>2</sup>.

30 Para los ensayos de toxicidad, el dendrón con fórmula I fue resuspendido en PBS, y añadido a cada pocillo a una concentración final de 1  $\mu$ g/ul, 0,5  $\mu$ g/ul, 0, 25  $\mu$ g/ul, 0,12  $\mu$ g/ul, 0, 06  $\mu$ g/ul, 0,03  $\mu$ g/ul. La toxicidad fue medida como una baja de la TEER, o la separación de las

uniones entre células medida por inmunohistoquímica con anticuerpos frente ocludina, proteína específica de las uniones epiteliales (Figura 9).

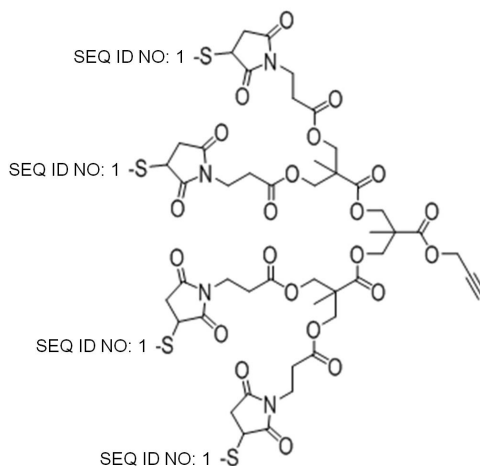
**Ejemplo 4. Ensayos de inmuno-actividad del péptido SEQ ID NO: 1**

La actividad inmunogénica se realizaron como ensayos de proliferación con células mononucleadas (PMBCs) obtenidas a partir de sangre periférica de voluntarios. PMBCs fueron aisladas de 100 ml de sangre diluido con PBS (1:1) mediante centrifugación en gradiente de densidad de *Lymphoprep* (Axis-Shield, Oslo, Noruega). Los cultivos se establecieron por triplicado en placas de 96 pocillos (Costar, Nueva York, EE.UU.) a  $5 \times 10^5$  células por pocillo para el análisis de la proliferación en un volumen total de 200ul de medio RPMI (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), suplementado con 10% (v /v) de suero fetal bovino (Invitrogen), Mercaptoetanol 0,02 mM, 2 mM de glutamina y 10 mM HEPES, en presencia de 1ug/ul, y 0,5ug/mL del péptido SEQ ID NO: 1, durante 5 días a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% humidificado. Durante la última 16 h, se añadió [<sup>3</sup>H]-timidina (0,5 uCi/pocillo) y se midió la proliferación como la radiactividad incorporada en un contador de centelleo. El índice de estimulación (SI) se calculó como la relación entre las cuentas (cpm) obtenidas con el péptido SEQ ID NO: 1 y las cuentas obtenidas sin estímulo (Figura10).

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos un 72% con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, entendiendo por identidad el grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido  
5 mediante el alineamiento de las dos secuencias,
- así como cualquiera de las sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables de dicho péptido.
- 2.- El péptido según la reivindicación 1, donde dicho péptido es un péptido idéntico a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
- 10 3.- Un polinucleótido de ADN o ARN capaz de traducirse a o codificar para un péptido tal y como se ha definido éste en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 4.- Un polinucleótido de ADN o ARN capaz de traducirse a, o codificar para una secuencia aminoacídica que comprende un péptido idéntico a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
- 15 5.- Una construcción genética de ADN o ARN, que comprende:
- a) una secuencia de nucleótidos tal y como se han definido éstos en cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4; o
- b) un sistema o vector de expresión génica que comprende una secuencia de nucleótidos según se ha definido en el apartado a), operativamente enlazado con, al  
20 menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.
- 6.- Un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de unirse de forma específica con un péptido tal y como se ha definido este en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 25 7. Un compuesto que comprende un péptido según la reivindicación 1 o 2, donde dicho péptido se ha unido químicamente a un dendrón, dendrímero o sistema dendrimérico.
- 8.- El compuesto de la reivindicación 7, que comprende una o más copias, preferiblemente dos o más, tres o más o cuatro o más copias, de un péptido unido químicamente a un dendrón, dendrímero o sistema dendrimérico según la reivindicación anterior, donde dicho  
30 péptido es la SEQ ID NO 1.

9.- El compuesto que comprende un péptido unido químicamente a un dendrón, dendrímero o sistema dendrimérico según la reivindicación 7, donde dicho compuesto se caracteriza por presentar la formula I identificada abajo:



5

Fórmula (I)

así como cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables.

10.- Una composición que comprende:

- a) un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y/o
- 10 b) un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, y/o
- c) una construcción genética según la reivindicación 5, y/o
- d) un compuesto tal y como se identifica éste en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9; y/o
- d) un anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 6.

15 11.- La composición según la reivindicación 10, donde dicha composición es una composición farmacéutica.

12.- La composición según la reivindicación anterior, donde dicha composición farmacéutica además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipientes y opcionalmente al menos un adyuvante.

13. - La composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, que además comprende otro principio activo.

14.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde dicha composición es una vacuna.

5 15.-Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, de una construcción genética según la reivindicación 5, de un anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 6, de un compuesto tal y como se ha definido éste en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o de  
10 14, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la alergia.

16.- El uso según la reivindicación anterior, donde la alergia es generada por proteínas transportadoras de lípidos (LTPs), preferiblemente procedentes de material vegetal.

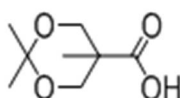
15 17.- El uso según la reivindicación 16, donde la proteína transportadora de lípidos (LTP) es Pru p 3 o (un) fragmento(s) de la misma.

18.- El uso según la reivindicación 16, donde la alergia es generada por LTPs o (un) fragmento(s) de las mismas procedentes de material vegetal de la Familia *Rosaceae*.

19. El uso según la reivindicación 16, donde la alergia es generada por LTPs o (un) fragmento(s) de las mismas procedentes de material vegetal de la especie *Prunus pérsica*  
20 (melocotón o durazno).

20.- Procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula (I) que comprende los siguientes pasos:

a) obtener un compuesto de fórmula (II) a partir del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA):

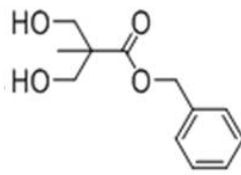


25

Fórmula (II)

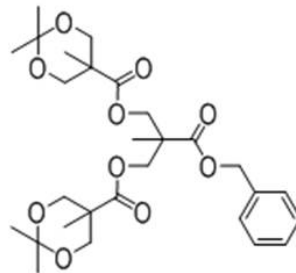
b) obtener un compuesto de fórmula (III) a partir del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA):





Fórmula (III)

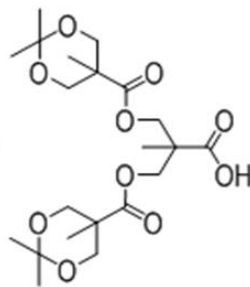
c) obtener un compuesto de fórmula (IV) uniendo el compuesto de fórmula (II) del paso a) al de fórmula (III) del paso b):



5

Fórmula (IV)

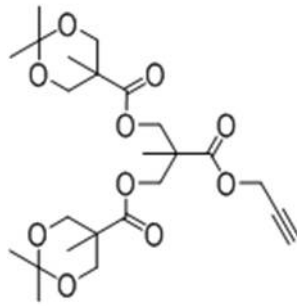
d) obtener un compuesto de fórmula (V) a partir del compuesto de fórmula (IV) del paso c):



10

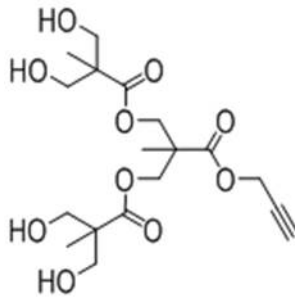
Fórmula (V)

e) obtener un compuesto de fórmula (VI) a partir del compuesto de fórmula (V) del paso d):



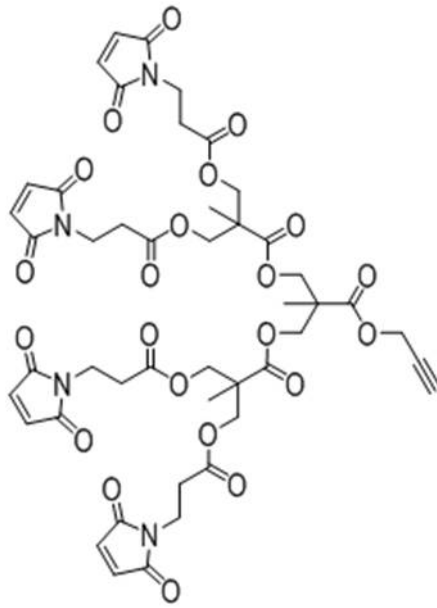
Fórmula (VI)

f) obtener un compuesto de fórmula (VII) a partir del compuesto de fórmula (VI) del paso e):



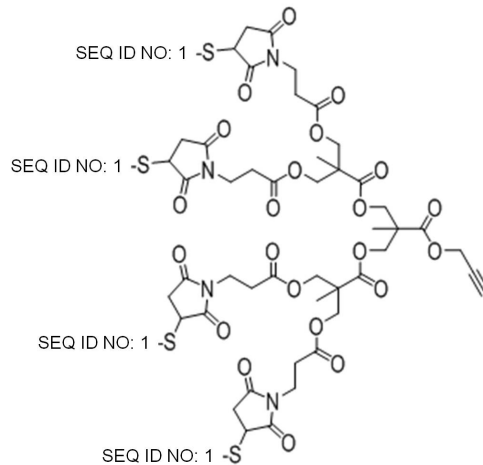
Fórmula (VII)

g) obtener un compuesto de fórmula (VIII) a partir del compuesto de fórmula (VII) del paso f):



Fórmula (VIII)

h) obtener un compuesto de fórmula (I) a partir del compuesto de fórmula (VIII) del paso g):

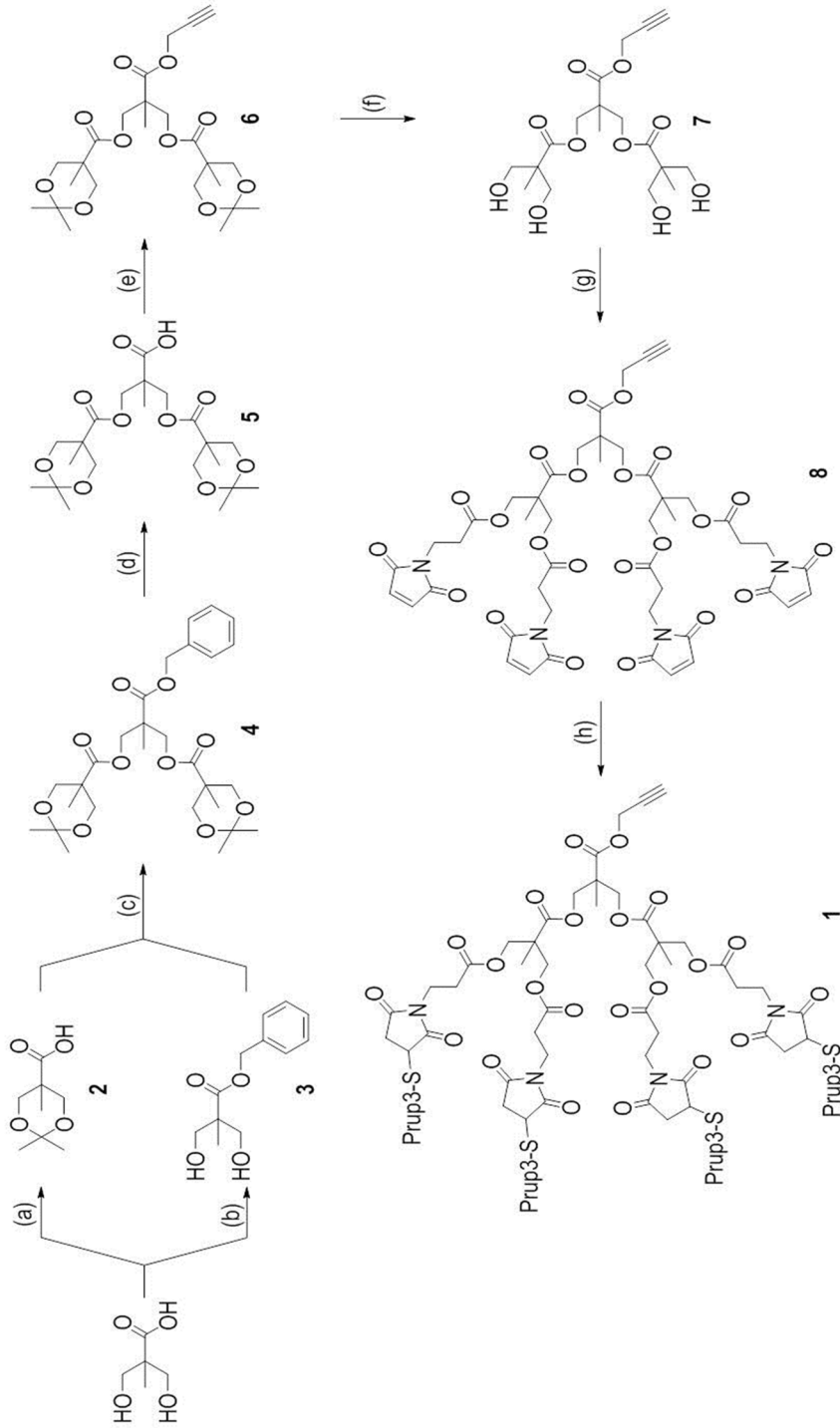


Fórmula (I)

21.- El procedimiento según la reivindicación anterior, donde el compuesto de fórmula (II) del paso a) se obtiene mediante protección del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA).

22.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21, donde el compuesto de fórmula (III) del paso b) se obtiene añadiendo hidróxido potásico y bromuro de bencilo al ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA).

- 23.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, donde el compuesto de fórmula (IV) del paso c) se obtiene por esterificación del compuesto de fórmula (II) del paso b) con el compuesto de fórmula (III) del paso c).
- 24.- El procedimiento según la reivindicación anterior, donde se utilizan como catalizadores de la reacción de esterificación la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *p*-tolueno sulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio.
- 25.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, donde el compuesto de fórmula (V) del paso d) se obtiene por hidrogenación catalítica del compuesto de fórmula (IV) del paso c).
- 26.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, donde el compuesto de fórmula (VI) del paso e) se obtiene mediante reacción del alcohol propargílico con el compuesto de fórmula (V) del paso d).
- 27.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26, donde el compuesto de fórmula (VII) del paso f) se obtiene mediante transesterificación del grupo isopropilideno del compuesto de fórmula (VI) del paso e).
- 28.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 27, donde el compuesto de fórmula (VIII) del paso g) se obtiene acoplado el ácido 3-maleimido propiónico al compuesto de fórmula (VII) del paso f).
- 29.- El procedimiento según la reivindicación anterior, donde además se utilizan como catalizadores la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *p*-tolueno sulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio.
- 30.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 29, donde el compuesto de fórmula (I) del paso h) se obtiene añadiendo al menos un péptido tal y como se ha definido este en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, al compuesto de fórmula (VIII) del paso g).



Reactivos y condiciones: (a) 2,2-dimetoxipropano, TsOH·H<sub>2</sub>O, acetona, 71%; (b) BnBr, KOH, DMF, 63%; (c) DCC, DPTS, seco CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 85%; (d) H<sub>2</sub>, Pd/C, AcOEt, 90%; (e) Alcohol propargílico, DCC, CPTS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 82%; (f) DOWEX H<sup>+</sup>, MeOH, 94%; (g) ácido 3- maleimido propiónico, DCC, DPTS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 86%; (h) SEQ ID NO: 1 (Prup3SH), buffer fosfato pH 7,4, ACN, 44%

Fig.1

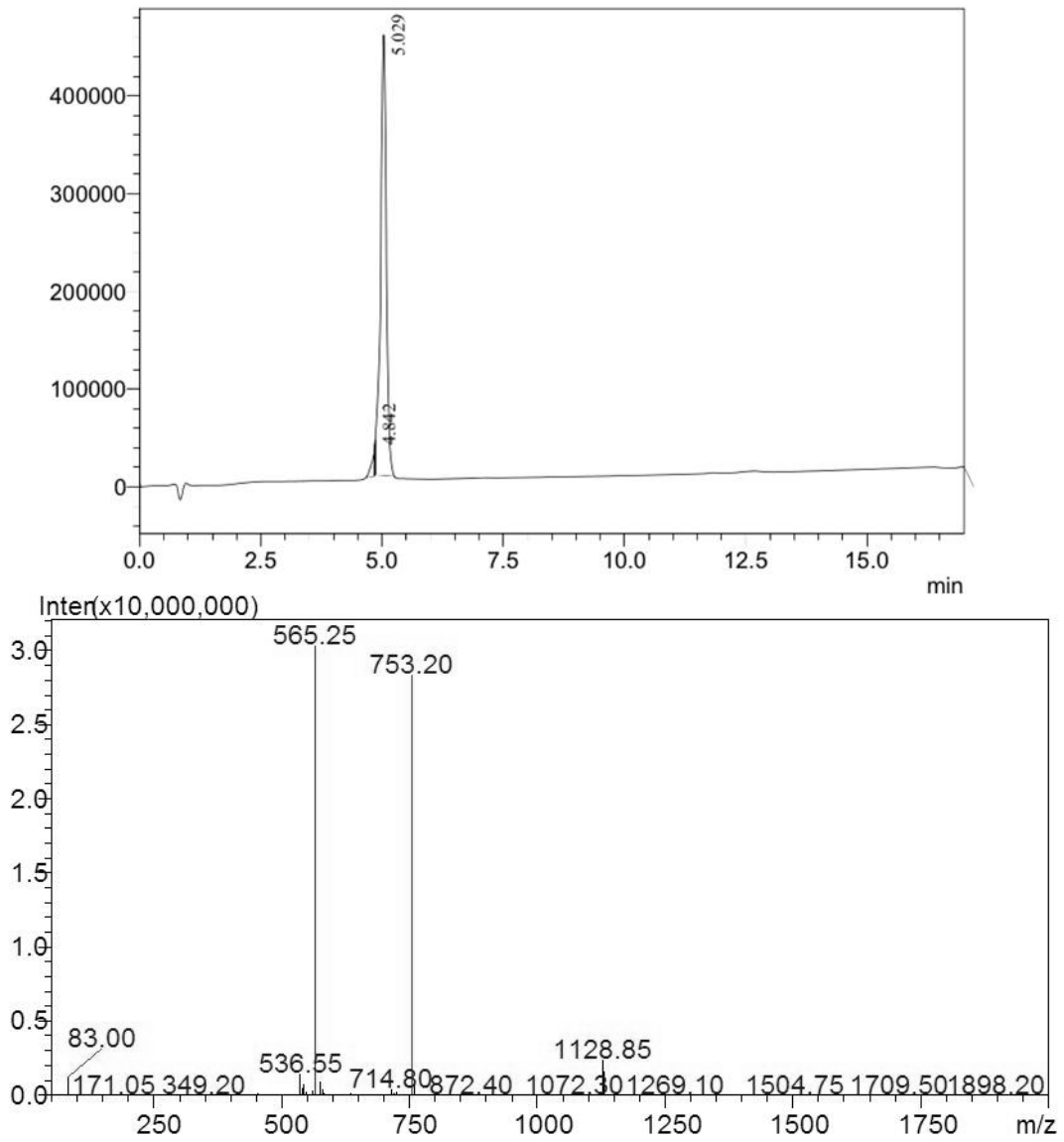


Fig.2

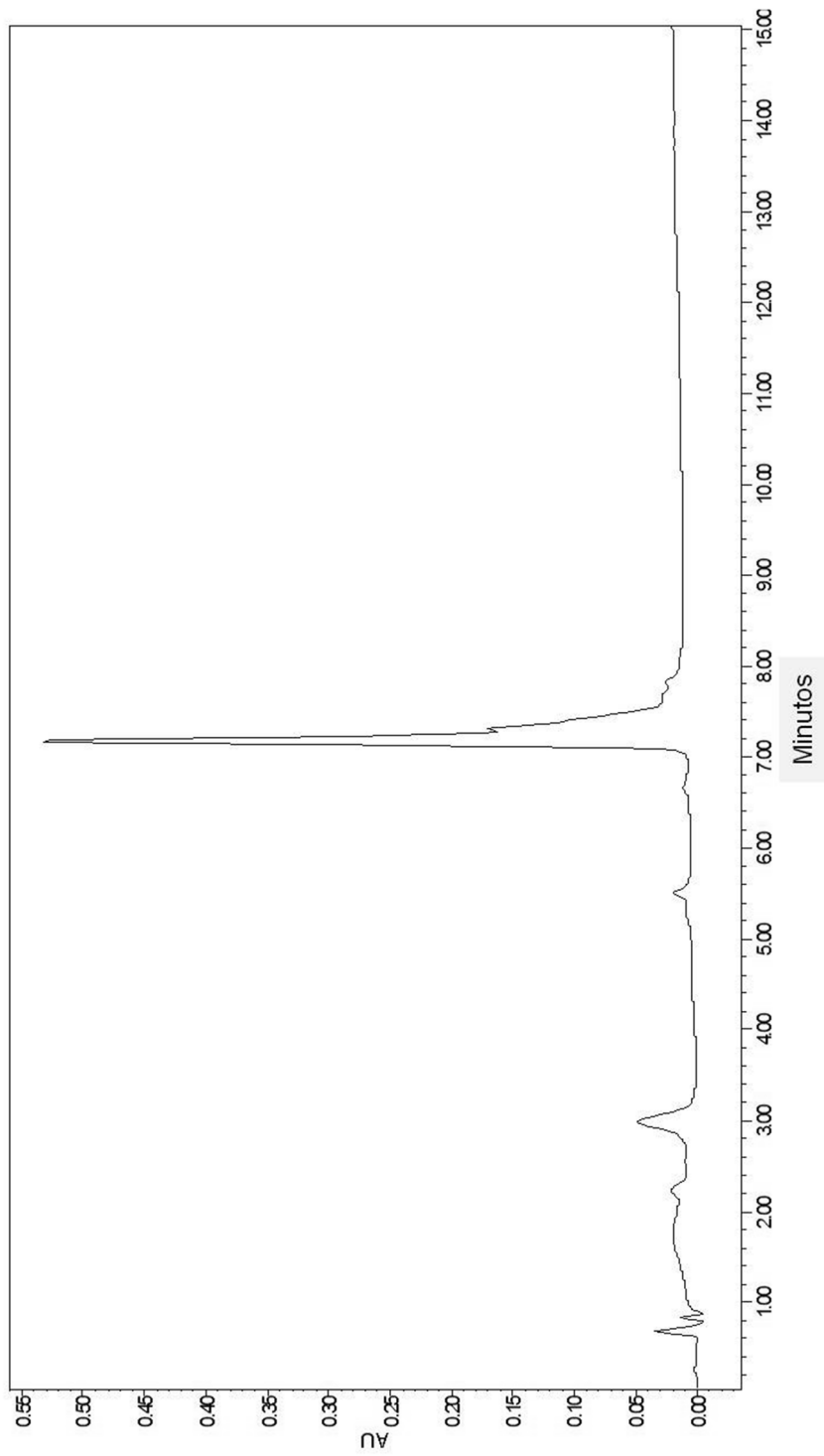


Fig.3

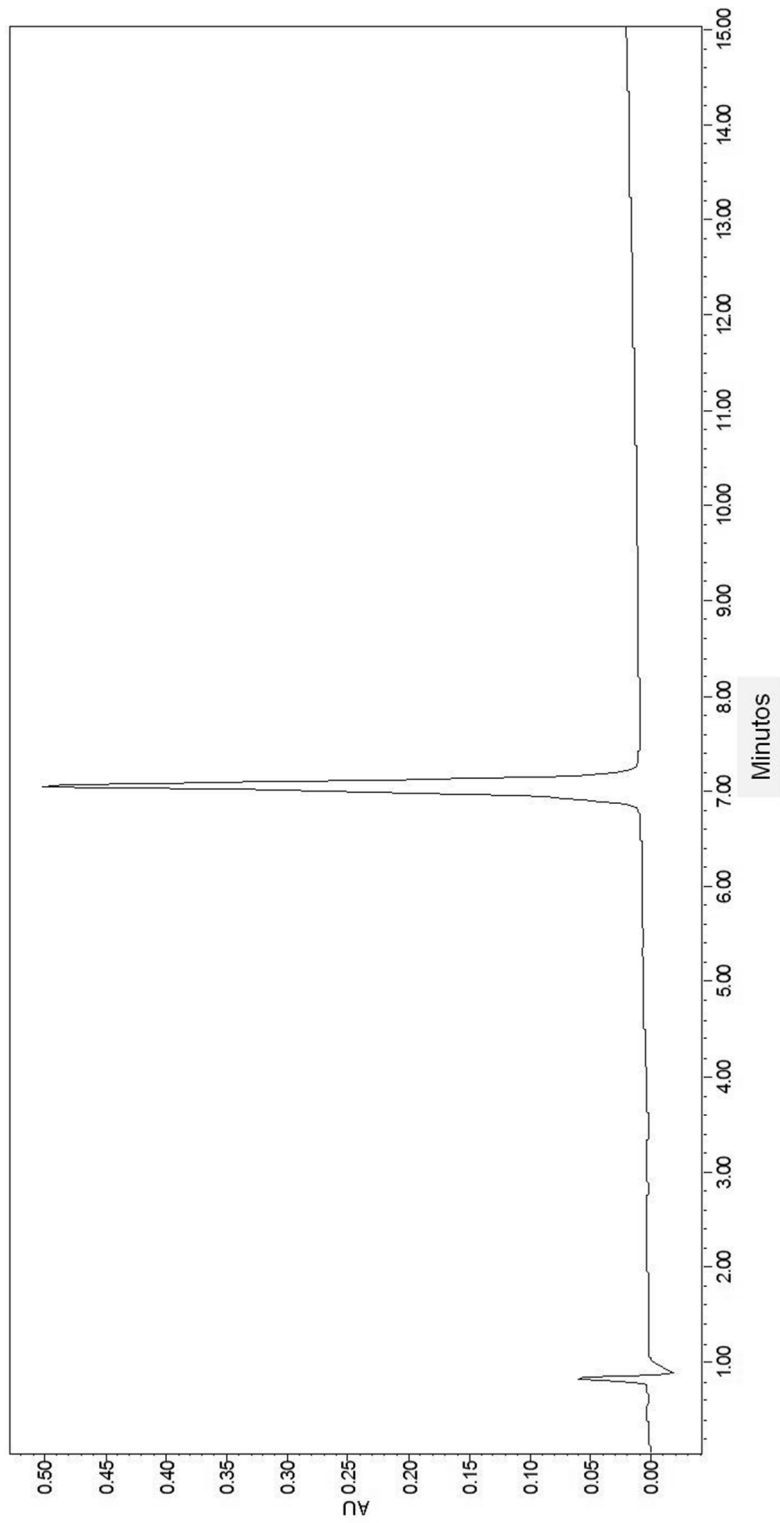


Fig.4



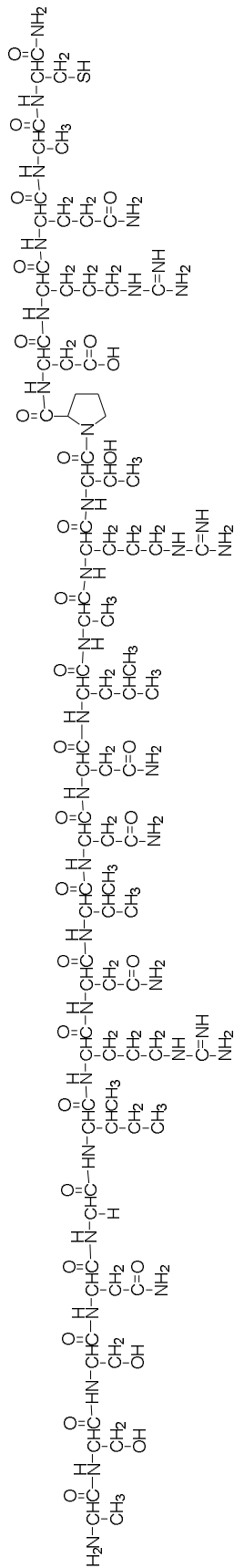


Fig.4 (cont.)

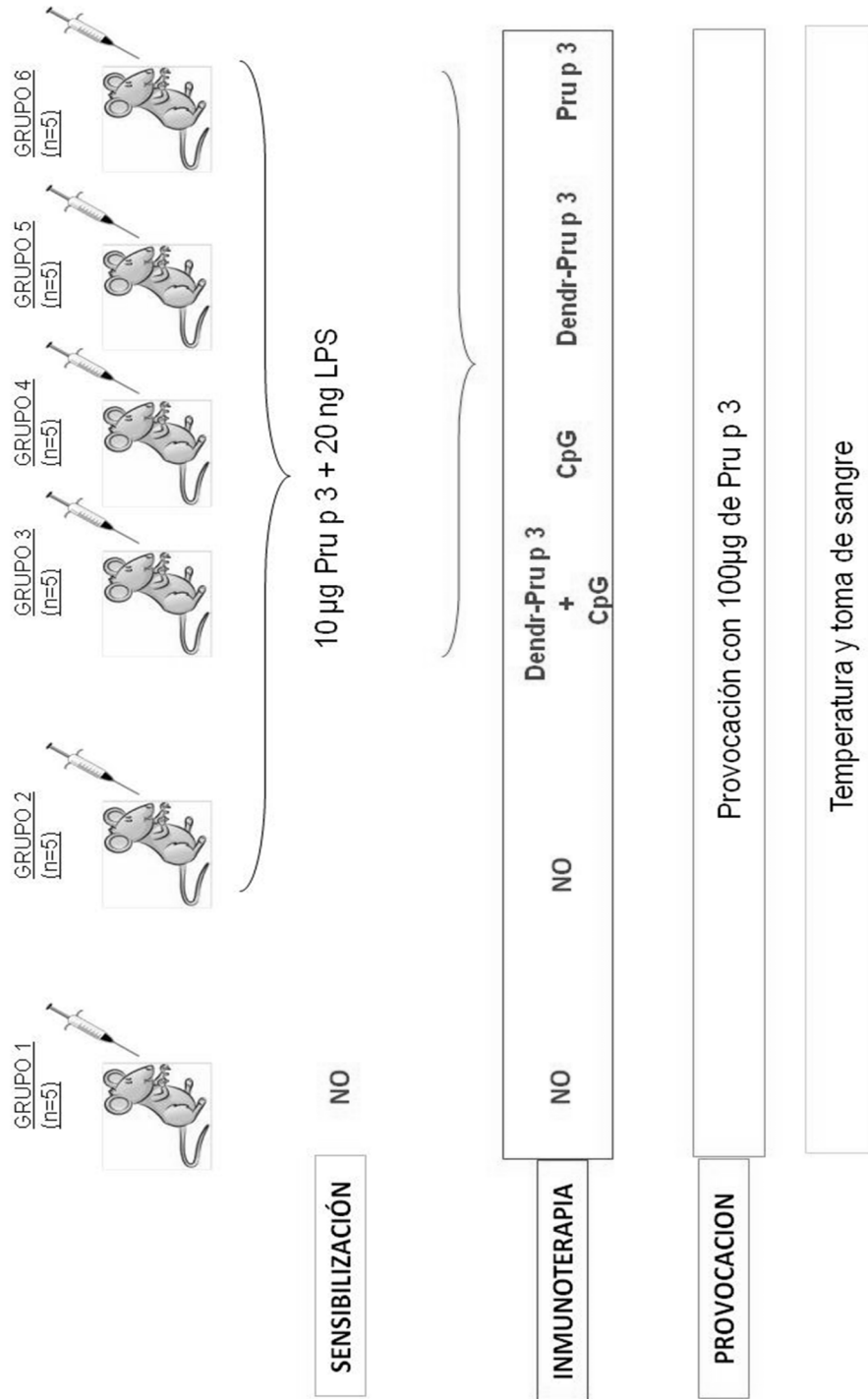


Fig.5

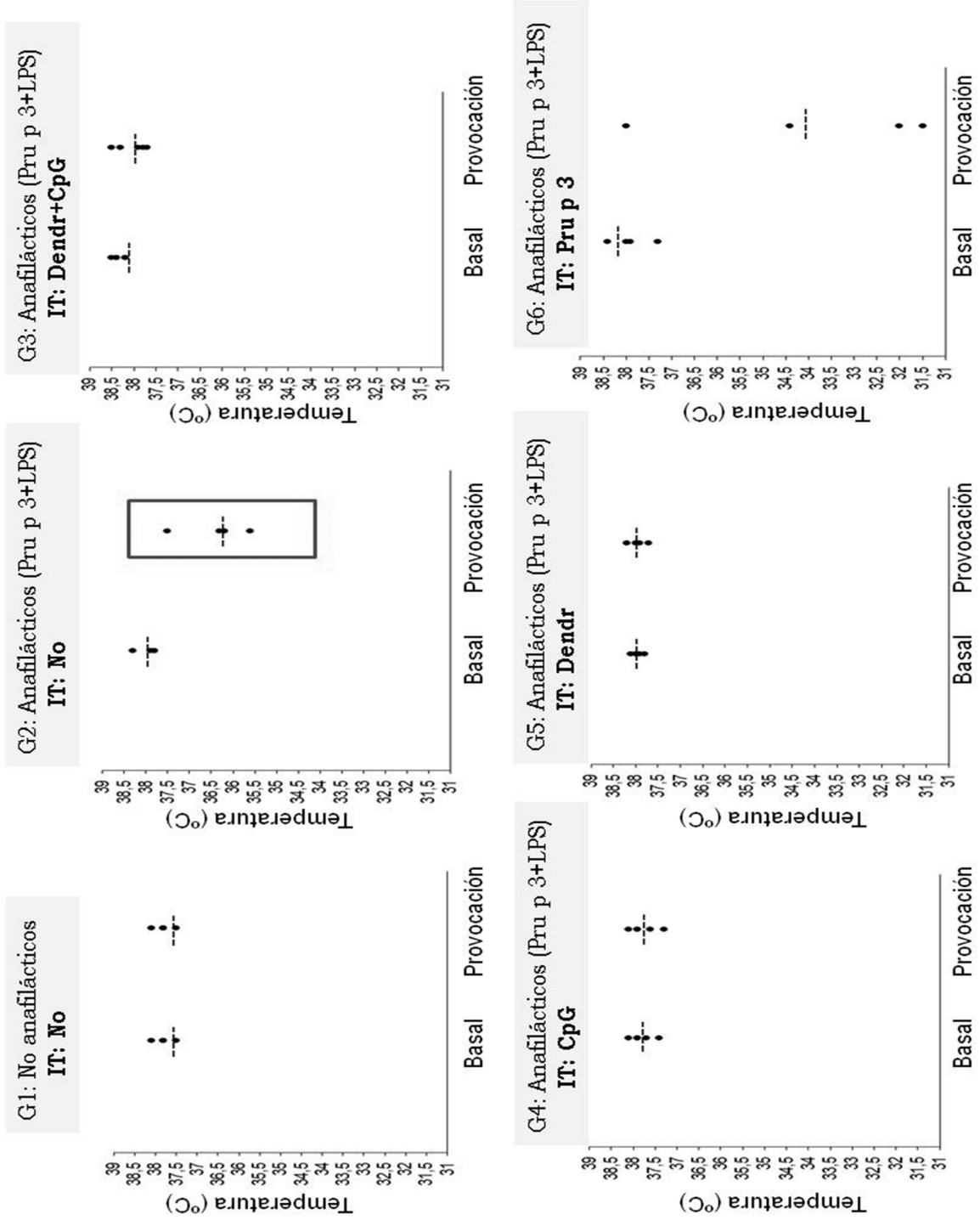


Fig.6

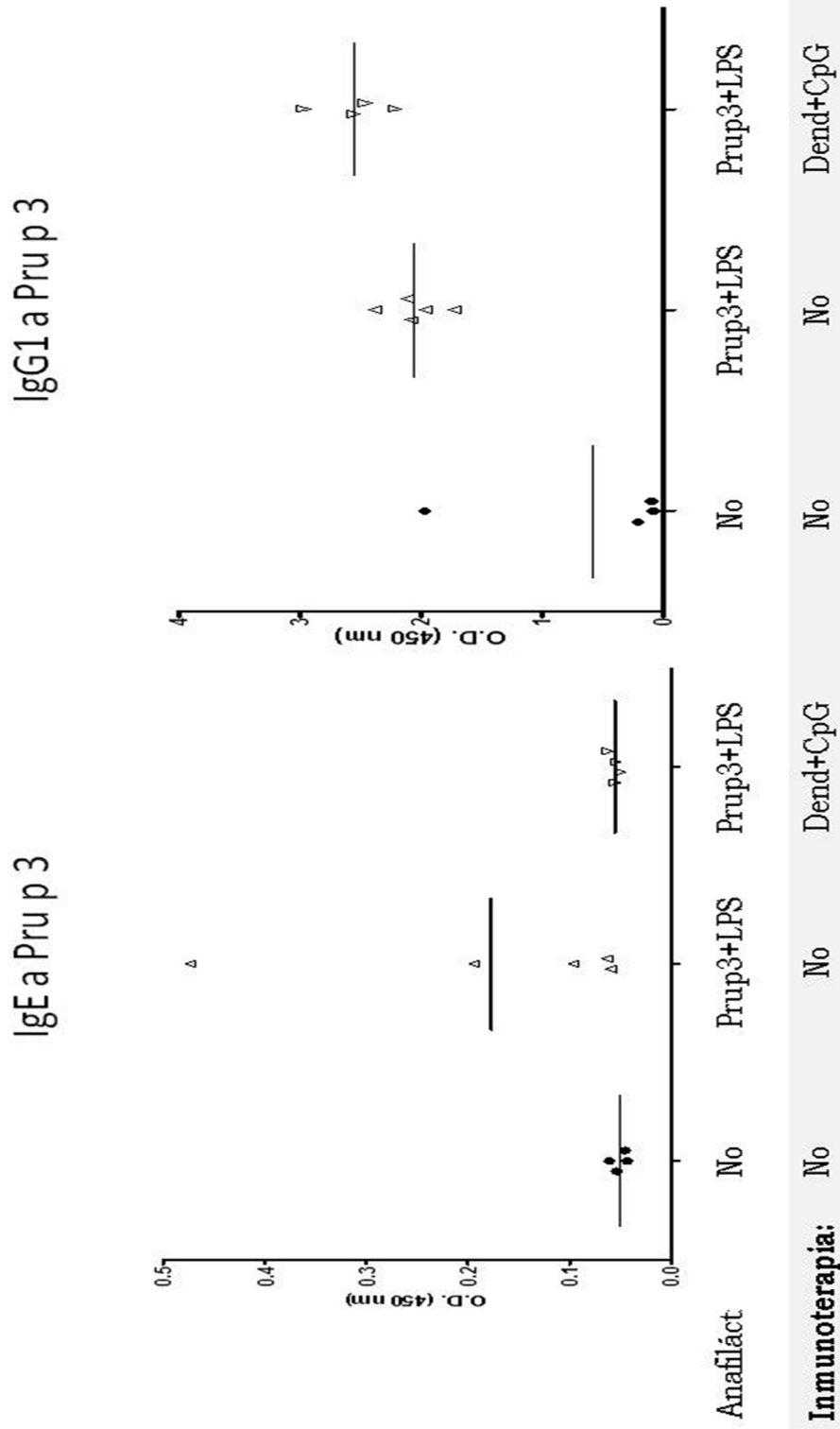


Fig.7

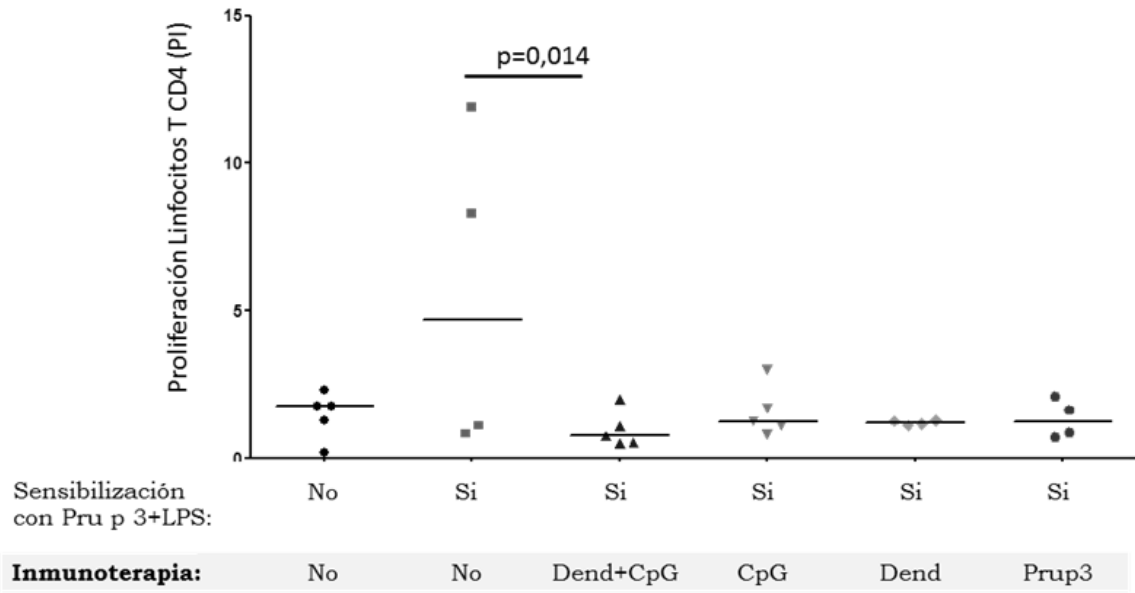


Fig.8

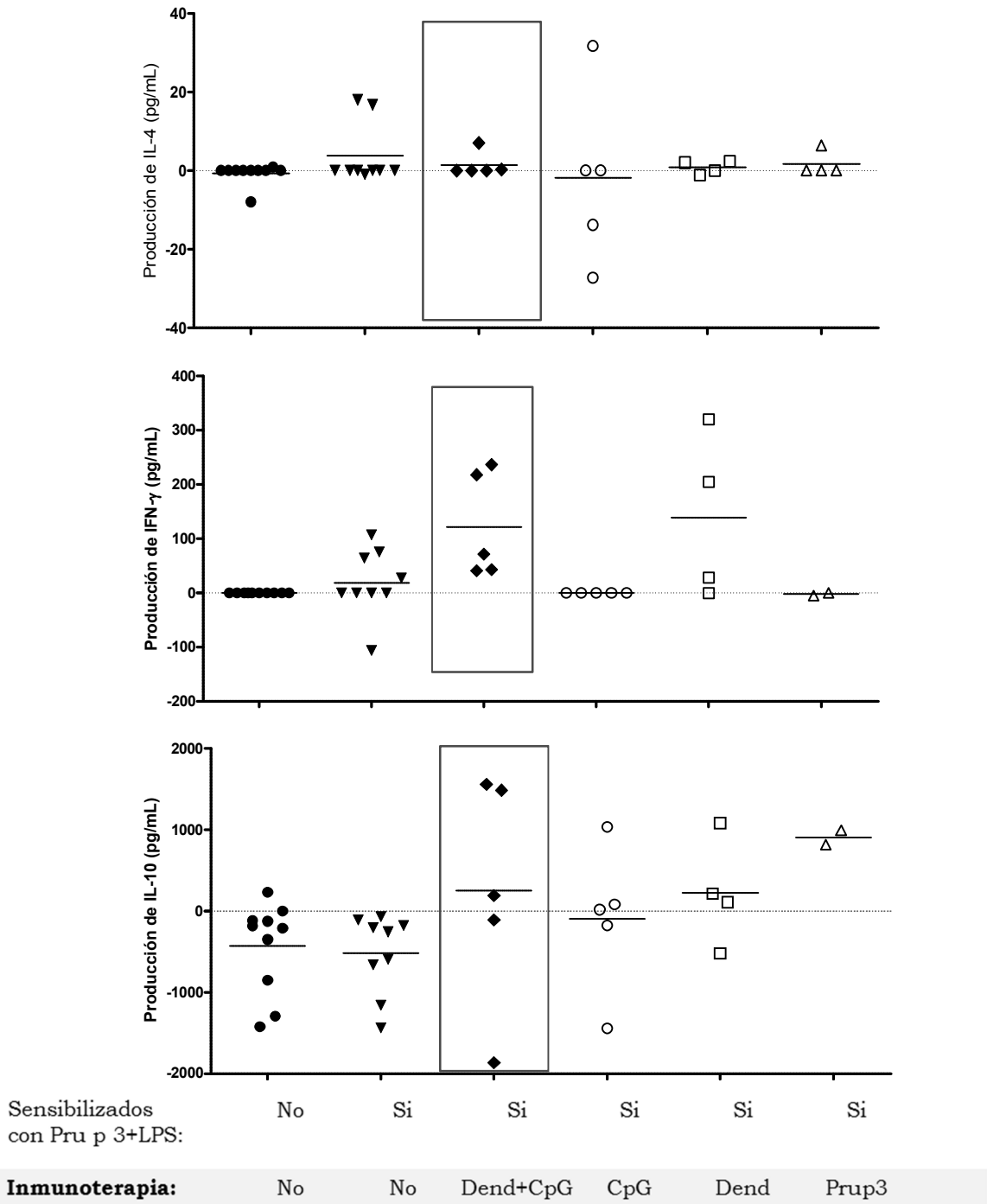
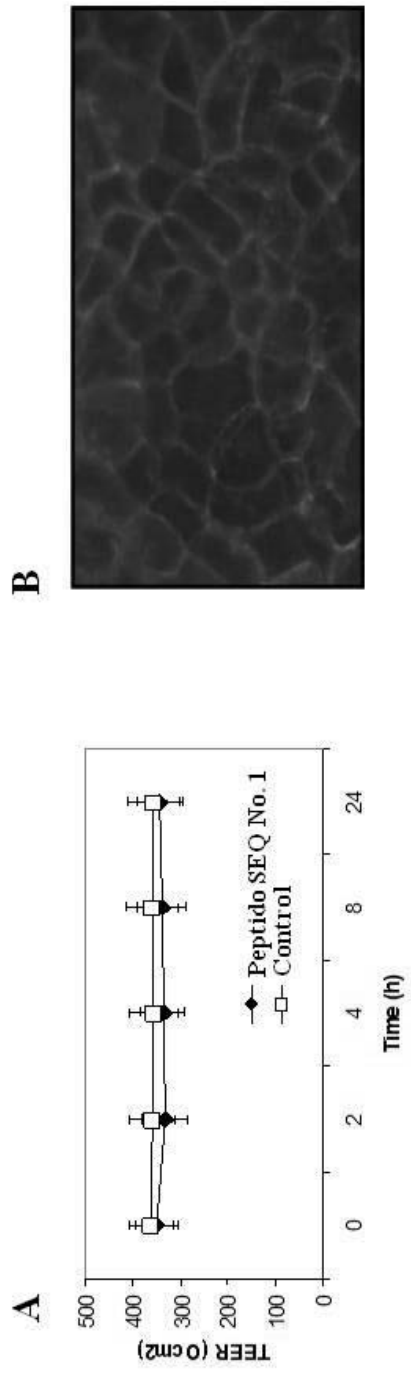


Fig.8 (cont.)



**Fig.9**

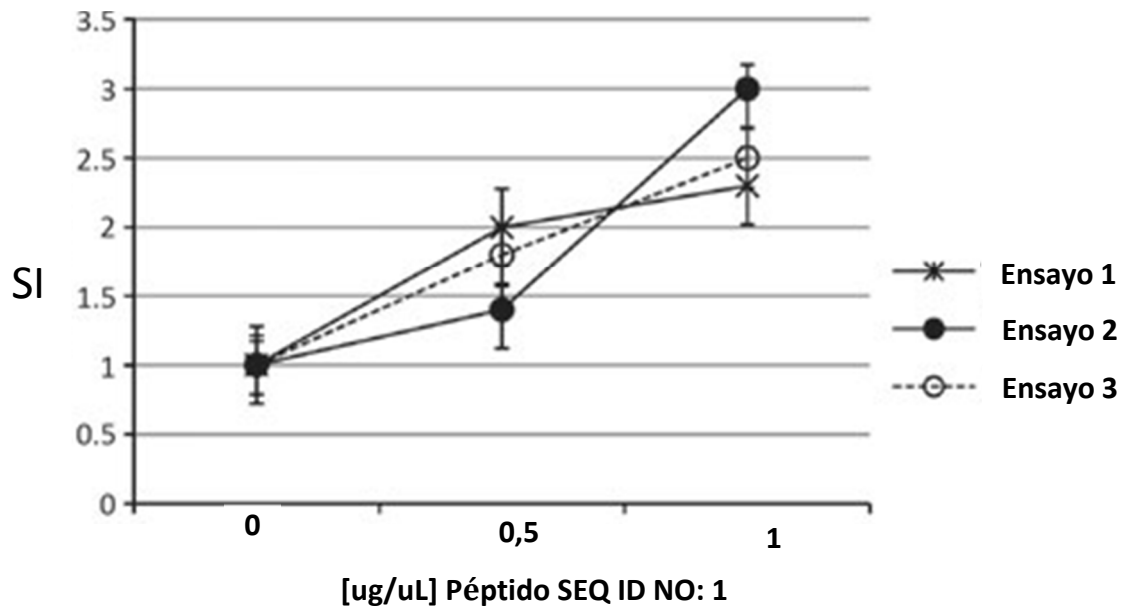


Fig.10



Listado de Secuencias

<110> CSIC  
 UNIVERSITAT POMPEU FABRA  
 UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID  
 SAS

<120> Composición para el tratamiento de la alergia

<130> 901032

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> SEQ ID No.: 1

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)..(21)  
 <223> AMIDATION

<400> 1

Ala Ser Ser Asn Gly Ile Arg Asn Val Asn Asn Leu Ala Arg Thr Pro  
 1 5 10 15

Asp Arg Gln Ala Cys  
 20

<210> 2  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Prup3SH

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)..(21)  
 <223> AMIDATION

<400> 2

Ala Ser Ser Asn Gly Ile Arg Asn Val Asn Asn Leu Ala Arg Thr Pro  
 1 5 10 15

Asp Arg Gln Ala Cys  
 20