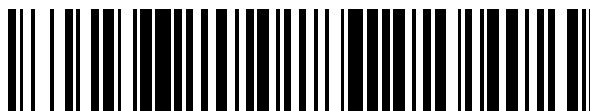


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 095**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2004 PCT/NL2004/000892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2005 WO05060994**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2004 E 04808808 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 1696951**

54 Título: **Inmunoterapia para alergia alimentaria mediante alérgenos alimentarios reducidos y
alquilados**

30 Prioridad:

23.12.2003 EP 03079161

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
18.07.2017

73 Titular/es:

**HAL ALLERGY HOLDING B.V. (100.0%)
J.H. Oortweg 15
2333 CH Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**KOPPELMAN, STEFAN, JOHAN;
PENNINKS, ANDREAS, HENDRIKUS y
KNIPPELS, LÉON, MATHIEU, JOHANNES**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 625 095 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

Inmunoterapia para alergia alimentaria mediante alérgenos alimentarios reducidos y alquilados

La invención se refiere a un tratamiento de individuos humanos que padecen alergia alimentaria

5 Los humanos muy frecuentemente padecen reacciones alérgicas más o menos graves después del consumo de proteínas dietéticas. La prevalencia de la alergia alimentaria es aproximadamente del 1-2% en adultos y del 6-8% en niños. La alergia alimentaria se asocia principalmente a un rango limitado de productos alimenticios, principalmente cacahuetes, frutos secos, huevos de gallina, leche de vaca, trigo (gluten), soja, pescado y mariscos.

10 La aparición de reacciones alérgicas se asocia con una reacción del sistema inmune del individuo a la exposición de un alérgeno particular. En un individuo que tiene tendencia a desarrollar una alergia a un alérgeno particular, la exposición por primera vez normalmente no da lugar a ninguna reacción alérgica. El alérgeno es recogido por una célula presentadora de antígenos (APC), tal como un macrófago o una célula dendrítica, que degrada el alérgeno. Fragmentos del alérgeno se presentan a las células T CD4+, que pueden responder fundamentalmente de dos maneras diferentes. Las células T secretan citoquinas que tienen efectos sobre otras células del sistema inmune, en particular las células B. Se subdividen en dos categorías. La primera categoría contiene células T helper-1, que secretan entre otros interleucina-2 (IL-2) e interferón- γ (IFN- γ). La presencia de IFN- γ inducirá a las células B a producir subclases específicas de anticuerpos IgG. La segunda categoría contiene células T helper-2. Estas secretan diferentes citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-13. La producción de IL-4 e IL-13 es necesaria para el inicio y el mantenimiento de anticuerpos IgE producidos por células B. Estos anticuerpos IgE tendrán especificidad para el alérgeno.

20 Tras cada exposición adicional del individuo al alérgeno particular, dicho alérgeno se unirá a los anticuerpos IgE disponibles, en particular a los que están unidos a la superficie de los mastocitos o basófilos. Como los alérgenos tienen normalmente varios sitios que se pueden unir a los anticuerpos IgE, esos anticuerpos en efecto se vuelven reticulados. El resultado de la reticulación de los anticuerpos IgE unidos a la superficie es que los mastocitos y basófilos se desgranulan y liberan mediadores como histaminas que desencadenan reacciones alérgicas.

25 Hasta la fecha, no está disponible un tratamiento eficaz de las alergias alimentarias. La mayoría de los individuos alérgicos se adaptan a su situación y evitan el consumo de productos alimenticios a los que son alérgicos. Están disponibles terapias que implican fármacos, tales como antihistamínicos, descongestionantes o esteroides pero sólo combaten los síntomas de una reacción alérgica. No evitan que futuras exposiciones al alérgeno causen nuevas reacciones alérgicas.

30 En el pasado, se ha propuesto tratar las alergias sobre la base de la inmunoterapia. Dicho tratamiento implica inyecciones repetidas de extractos alérgenos durante un largo periodo para desensibilizar a un paciente del alérgeno. Esta terapia, sin embargo, lleva mucho tiempo, implicando generalmente años de tratamiento, y frecuentemente no logra alcanzar el objetivo de desensibilizar al paciente al alérgeno. Además, en particular en las alergias alimentarias, no es un tratamiento seguro. En muchas alergias alimentarias, las reacciones alérgicas están asociadas con un riesgo significativo de anafilaxia, que es un tipo de reacción alérgica sistémica y potencialmente letal.

40 Por consiguiente, existe una necesidad de un tratamiento eficaz de alergias, en particular alergias alimentarias. Dicho tratamiento debe hacer posible a un individuo que padece una alergia vencer su afección hasta tal punto que se pueda arriesgar con seguridad a futuras exposiciones a los alérgenos asociados con su tipo particular de alergia. Esto mejoraría enormemente la calidad de vida del paciente porque ya no tendrá que examinar minuciosamente su dieta para detectar la posible presencia de alérgenos.

45 De acuerdo con la invención, se ha encontrado que las proteínas dietéticas se pueden modificar de una manera específica que permita su uso en inmunoterapia. Por consiguiente, la invención se refiere a un método para tratar a un individuo que padece una alergia alimentaria o que tiene una tendencia a desarrollar una alergia alimentaria administrando a dicho individuo un alérgeno alimentario modificado, en donde el alérgeno alimentario se modifica mediante reducción y alquilación.

50 En términos generales, el método está dirigido a tratar individuos que padecen o que tienen una tendencia a desarrollar una alergia alimentaria producida por una proteína alimentaria alergénica que tiene uno o más enlaces disulfuro. Como tal, el método se puede poner en práctica en forma de terapia, pero también como tratamiento profiláctico. El método comprende administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una forma modificada de la proteína alimentaria alergénica. La modificación realizada de acuerdo con la presente invención da como resultado fundamentalmente que la proteína no tiene ninguna capacidad de formar enlaces disulfuro.

55 La secuencia de aminoácidos primaria y las posiciones de los enlaces disulfuro influyen fuertemente en la estructura general de la proteína. Por ejemplo, ciertas cadenas laterales permitirán, o favorecerán, el enlace de hidrógeno entre aminoácidos vecinos del esqueleto polipeptídico dando como resultado estructuras secundarias tales como láminas β o hélices α . Estas estructuras secundarias pueden interactuar con otras estructuras secundarias dentro del mismo polipéptido para formar motivos o dominios (es decir, estructura terciaria). Un motivo es una combinación común de

estructuras secundarias y un dominio es una parte de una proteína que se pliega independientemente. Muchas proteínas están compuestas de subunidades múltiples y, por lo tanto, presentan una estructura cuaternaria.

5 Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la modificación de la proteína alimentaria alergénica por reducción y alquilación da como resultado la rotura de enlaces disulfuro de manera que da como resultado un ditiol, seguido por el impedimento eficaz de la formación de nuevo de los enlaces disulfuro debido a la presencia de las cadenas alquílicas.

10 Sorprendentemente, la exposición de un individuo alérgico a un alérgeno modificado como se describe no sólo es seguro y no causa ninguna reacción alérgica significativa, sino que también es posible desensibilizar eficazmente al individuo del alérgeno. Se ha encontrado que el sistema inmune del individuo que presenta un alérgeno modificado como se ha descrito conduce a una reducción o a evitar la producción de anticuerpos IgE específicos. En un individuo con una alergia desarrollada, la respuesta de IgE del sistema inmunológico puede estar regulada en disminución desviando la respuesta inmune de una reacción mediada por T helper-2 hacia una reacción mediada por T helper-1. Como resultado, después de completar el tratamiento, el individuo ya no necesita evitar el consumo de productos alimenticios que contienen la proteína dietética a la que solía ser alérgico.

15 El término "alérgeno" se utiliza aquí en la presente memoria y posteriormente para significar una sustancia que, cuando se expone a un mamífero, será capaz de aumentar una respuesta inmune dando como resultado anticuerpos de la clase IgE y que también será capaz de desencadenar una reacción alérgica cuando el mamífero se expone más tarde a la sustancia. Los alérgenos en términos de la presente invención son proteínas alimentarias alergénicas, que pueden consistir en una proteína o una proteína combinada con un lípido o un hidrato de carbono tal como una glicoproteína, un proteoglucano, una lipoproteína, etc.

20 Un alérgeno que se modifica como se describe para su uso en inmunoterapia puede en principio ser cualquier proteína alimentaria alergénica. Las proteínas alimentarias alergénicas típicas a menudo contienen enlaces o puentes disulfuro (en la presente memoria, los términos "enlaces" y "puentes" en el contexto de puentes disulfuro se utilizarán indistintamente), que son relativamente estables al calor y a la digestión (p. ej., el efecto de la pepsina). En una realización preferida, el alérgeno pertenece a la familia de proteínas de almacenamiento de semillas, de las cuales se prefieren particularmente las albúminas 2S, las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) y las conglutinas. De las albúminas 2S, se prefieren las albúminas 2S de frutos secos y semillas, y en particular la albúmina 2S de la nuez de Brasil. Otros ejemplos de albúminas 2S de frutos secos son las de avellanas, nueces, almendras, anacardos, pistachos, nueces de pecán, castañas, nueces de macadamia, nuez de nangai, bellotas y piñones. Ejemplos de albúminas 2S de semillas son las de linaza, semillas de amapola, semillas de colza, semillas de sésamo y semillas de girasol.

25 Las albúminas 2S son proteínas de almacenamiento en semillas y nueces que comparten características comunes con respecto a la organización estructural. Son pequeñas proteínas globulares compuestas de una subunidad pequeña y una grande que se mantienen unidas por enlaces disulfuro. Ambas subunidades se originan de un gen, expresado como un péptido de cadena sencilla que se procesa proteolíticamente. Para la albúmina 2S de la nuez de Brasil (*Ber e 1*), la subunidad grande es 9 kDa, y la subunidad pequeña es 3 kDa. Otra característica común de las albúminas 2S es su composición de aminoácidos. Son ricos en arginina, glutamina, asparagina y cisteína. En particular, la albúmina 2S de la nuez de Brasil tiene un alto contenido de cisteína (8%) y también de metionina (19%). Los aminoácidos que contienen azufre son esenciales para la dieta humana y animal, y la albúmina 2S de la nuez de Brasil se considera un nutriente valioso. La secuencia de aminoácidos de las albúminas 2S en diferentes especies es homóloga y se conservan los residuos de cisteína. Dentro de la especie de nuez de Brasil, se han encontrado varias isoformas de albúmina 2S con heterogeneidad en la cadena ligera. En general, se ha encontrado que la presencia de enlaces disulfuro aumenta la termoestabilidad, se encuentra a menudo en proteínas de bacterias termófilas, aumenta la estabilidad conformacional a temperatura ambiente y reduce la susceptibilidad para la digestión enzimática. Además, la estructura de la albúmina 2S de la nuez de Brasil muestra una gran estabilidad hacia la desnaturalización por calor y al desdoblamiento inducido por guanidinio.

30 Antes de la modificación, el alérgeno se aísla preferiblemente de su fuente biológica, tal como la nuez. Sin embargo, también es posible modificar un extracto bruto que comprende el alérgeno junto con otros componentes de la fuente biológica. Aunque esto puede dar como resultado la administración a un paciente de otras proteínas u otras sustancias modificadas por reducción y alquilación, esto no se considera dañino. Por lo tanto, se describe la administración de proteínas aisladas y posteriormente modificadas así como de extractos brutos de productos alimenticios que contienen alérgenos, preferiblemente nueces, tales como los que se pueden obtener por molienda, trituración, etc., que han sido sometidos a reacciones de reducción y alquilación según la presente invención.

35 El aislamiento del alérgeno se puede realizar por cualquier método conocido, tal como métodos que implican extracción y cromatografía líquida. Los métodos para aislar alérgenos de diversas fuentes biológicas son conocidos per se y pueden ser adaptados convenientemente a las necesidades de las circunstancias por el experto en la técnica basándose en su conocimiento general común.

El alérgeno se puede obtener también comercialmente, como por ejemplo de Allergon AB, Angelholm, Suecia, de ALK Albello, Horsam, Dinamarca, o de Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Suecia.

El alérgeno se modifica por reducción y alquilación. Se prefiere que la reducción se lleve a cabo antes que la alquilación. La reducción y alquilación de proteínas son conocidas per se. Para una visión general, se hace referencia a Herbert et al, Electrophoresis (2001), 22: 2046. Se entenderá que se prefiere que se utilicen solo reactivos que sean aceptables en el contexto de la producción de productos alimenticios o productos farmacéuticos.

- 5 En una realización preferida, la reducción se realiza utilizando un agente reductor seleccionado del grupo del 2-mercaptoetanol (β -ME), ditioneitol (DTT), ditioeritrol, cisteína, homocisteína, tributilfosfina, sulfito, sodio (ciano) borohidruro, lejía, glutatión, E-mercapto etilamina, ácido tioglicólico, sulfuro de metilo, sulfuro de etilo y combinaciones de los mismos. En general, los compuestos de alquiltiol (R-SH) proporcionan agentes reductores adecuados. Preferiblemente, se utilizan aquellos agentes reductores que rompen los enlaces disulfuro mientras se mantienen otras características químicas de la proteína. Por ejemplo, los grupos NH_2 se dejan preferiblemente intactos.

- 15 Alternativamente, la reducción se puede realizar utilizando medios enzimáticos, tales como utilizando proteínas que catalizan reacciones de intercambio tiol-disulfuro tales como por ejemplo glutarredoxina o tiorredoxina. Tales proteínas pueden ejercer su efecto a través de dos restos de cisteína vecinos (CXYC), que forman o un disulfuro (forma oxidada) o un ditiol (forma reducida). Alternativamente, se pueden utilizar proteínas que son capaces de catalizar el reordenamiento de los enlaces S-S tanto intracatenarios como intercatenarios en proteínas tales como la proteína disulfuro isomerasa u otros polipéptidos capaces de reducir los enlaces disulfuro, tal como se describe por ejemplo en el documento WO 00/70064.

- 20 La reacción de reducción se continúa hasta que se detiene la reacción y se han roto esencialmente todos los enlaces disulfuro en el alérgeno. Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la reducción pueden ser optimizadas dependiendo del agente reductor elegido por el experto en la técnica basándose en su conocimiento general. Normalmente, la reducción se llevará a cabo a pH neutro o casi neutro, preferiblemente a un pH entre 6 y 8, a concentraciones de agentes reductores en el intervalo adecuado de, o equivalente a, por ejemplo, aproximadamente 1-100 M de DTT (o β -ME), posiblemente mediante el uso de un tampón adecuado. Un ejemplo de un tampón adecuado comprende reactivos caotrópicos, tales como guanidina y/o urea. La temperatura durante la reducción estará generalmente entre la temperatura ambiente controlada o la ambiente y 70°C, opcionalmente bajo una atmósfera reductora, tal como una atmósfera anóxica, preferiblemente una atmósfera de nitrógeno (N_2). Por supuesto, se debe tener cuidado de que el alérgeno no se desnaturalice durante la reacción.

- 30 La alquilación se lleva a cabo preferiblemente bloqueando los radicales -SH que son el resultado de la escisión de los enlaces disulfuro durante la reducción. Los reactivos de alquilación preferidos se eligen del grupo de N-etilmalimida, cistamina, iodoacetamida, ácido yodoacético. Más generalmente, se puede reducir y alquilar al menos un enlace disulfuro para producir restos de cisteína con cadenas laterales que tienen la fórmula química $-\text{CH}_2-\text{S}-[\text{CH}_2]_n-\text{R}'$ en donde n es un número entero entre 1 y 5 y R' se selecciona de grupos de 1-5 carbonos que consisten en grupos alquilo (p. ej., metilo, etilo, n-propilo, etc.); grupos carboxialquilo (p. ej., carboximetilo, carboxietilo, etc.); grupos cianoalquilo (p. ej., cianometilo, cianoetilo, etc.); grupos alcóxicarbonilalquilo (p. ej., etoxicarbonilmetilo, etoxicarboniletilo, etc.); grupos carbamoilalquilo (p. ej., carbomoilmetilo, etc.); y grupos alquilamina (p. ej., metilamina, etilamina, etc.). Otros reactivos de alquilación adecuados incluyen alquilhalogenuros; alquilsulfatos; alquenos, preferiblemente alquenos terminales ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{H})-\text{R}$); y otros reactivos alquilantes conocidos por el experto en la técnica.

- 40 Alternativamente, la alquilación se puede realizar utilizando medios enzimáticos, tal como utilizando sulfhidroxidasa, por ejemplo como se puede obtener de la proteína de huevo de pollo.

Aunque estrictamente no es una reacción de alquilación, se describe la oxidación de los radicales -SH hacia por ejemplo SO_2 o SO_3 ya que la modificación de los enlaces disulfuro de la proteína se bloquea eficazmente como resultado de los mismos.

- 45 Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la reducción pueden ser optimizadas dependiendo del agente reductor elegido por el experto en la técnica basándose en su conocimiento general. Normalmente, la alquilación se llevará a cabo a pH neutro o casi neutro, preferiblemente a un pH entre 6 y 8, posiblemente mediante el uso de un tampón adecuado. La temperatura durante la alquilación se situará generalmente entre la temperatura ambiente o la temperatura ambiente controlada y 50°C.

- 50 La proteína alergénica modificada que se obtiene después de las reacciones de reducción y alquilación se caracteriza por tener una estructura secundaria considerablemente alterada. Por ejemplo, pueden estar ausentes las láminas- β o las hélices- β incluidas en la proteína nativa. También es concebible que las estructuras β permanezcan (parcialmente) intactas y que estén ausentes las hélices- α . La estructuración terciaria se puede reducir también como evidencia la energía libre de la proteína. En general, se mejora la digestibilidad por las peptidasas de la proteína modificada.

El alérgeno modificado descrito anteriormente, de acuerdo con la invención, se utiliza en inmunoterapia. En este contexto, se puede administrar en cualquier forma de dosificación adecuada.

Se entenderá que la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el alérgeno

modificado para inmunoterapia dirigida contra la alergia alimentaria. Una composición farmacéutica de la invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos modificados de la invención reivindicada. Una vez formuladas, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. La administración directa de las composiciones se logrará generalmente mediante inyección, bien oralmente, subcutáneamente, sublingualmente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, pulmonarmente o administrada al espacio intersticial de un tejido.

La composición farmacéutica también puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable adecuado y puede estar en forma de una cápsula, comprimido, pastilla, dragea, píldora, gotitas, supositorio, polvo, aerosol, vacuna, ungüento, pasta, crema, inhalante, parche, aerosol, y similares. Como portador farmacéuticamente aceptable, se puede utilizar cualquier disolvente, diluyente u otro vehículo líquido, adyuvante de dispersión o suspensión, agente tensioactivo, agente isotónico, agente espesante o emulsionante, conservante, agente encapsulante, ligante sólido o lubricante que sea más adecuado para un forma de dosificación particular y que es compatible con el alérgeno modificado. Se puede preferir incluir además un adyuvante, preferiblemente uno conocido para desviar la respuesta inmune hacia una respuesta mediada por T helper-1, en la forma de dosificación, para estimular o producir además una reacción del sistema inmune del paciente tras la administración. Los adyuvantes adecuados incluyen tales adyuvantes como adyuvante de Freund completo e incompleto e hidróxido de aluminio. También se concibe que el alérgeno modificado se incorpore en un producto alimenticio y se administre a un paciente junto con la ingesta de alimentos.

Una composición farmacéutica puede contener también un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier portador farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición, y que se pueda administrar sin excesiva toxicidad. Los portadores adecuados pueden ser grandes macromoléculas metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas. Tales portadores son bien conocidos por el experto ordinario en la técnica.

Se pueden utilizar en la misma sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Una discusión completa de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub Co., N.J. 1991).

Los portadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tales como agua, disolución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en tales vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH, y similares. Típicamente, las composiciones terapéuticas se preparan como inyectables, o como disoluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución en, o la suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. Los liposomas se incluyen dentro de la definición de un portador farmacéuticamente aceptable.

Para el tratamiento terapéutico, se pueden producir proteínas alergénicas modificadas como se describe anteriormente y aplicarse al sujeto necesitado de las mismas. Las proteínas alergénicas modificadas se pueden administrar a un sujeto por cualquier ruta adecuada, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha ruta y en una dosificación que es eficaz para el tratamiento pretendido. Las dosificaciones terapéuticamente eficaces de las proteínas alergénicas modificadas requeridas para disminuir la reacción alergénica a la forma nativa de la proteína o para desensibilizar al sujeto se pueden determinar fácilmente por el experto en la técnica, por ejemplo utilizando modelos animales.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se emplea en esta memoria se refiere a una cantidad de un agente terapéutico, viz. una proteína alimentaria alergénica modificada de acuerdo con la presente invención, para reducir o evitar reacciones alérgicas a proteínas alimentarias alergénicas, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. El efecto se puede detectar, por ejemplo, mediante niveles de antígeno IgE reducidos a la proteína alimentaria alergénica. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá del tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y el grado de la afección, y los agentes terapéuticos o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración. Por lo tanto, no es útil especificar una cantidad efectiva exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad efectiva para una situación dada se puede determinar por experimentación rutinaria y está dentro del criterio rutinario del médico o experimentador. Específicamente, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para reducir o evitar reacciones alérgicas a proteínas alimentarias alergénicas y/o manifestaciones biológicas o físicas que las acompañan. Dichas manifestaciones pueden incluir la contracción del músculo liso en las vías respiratorias o los intestinos, la dilatación de pequeños vasos sanguíneos y el aumento de su permeabilidad al agua y a las proteínas plasmáticas, la secreción de moco pegajoso denso y, en la piel, enrojecimiento, hinchazón y la estimulación de las terminaciones nerviosas que da como resultado picazón o dolor. Las manifestaciones que se pueden evitar mediante inmunoterapia de acuerdo con la presente invención incluyen manifestaciones cutáneas tales como erupciones, urticaria o eczema; manifestaciones gastrointestinales que incluyen calambres, náuseas, vómitos o diarrea; o manifestaciones respiratorias que incluyen estornudos o goteo

nasal, tos, sibilancias o dificultad para respirar. Otras manifestaciones que se pueden evitar pueden incluir picazón en la piel, sofocos, congestión, irritación ocular, asma, picazón en la boca o garganta que puede avanzar hasta provocar hinchazón y anafilaxia. Los métodos que permiten al médico establecer dosificaciones iniciales de inmunoterapia son conocidos en la técnica (p. ej., la patente US 4,243,651). Las dosificaciones determinadas que se administran deben ser seguras y eficaces.

Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz será de aproximadamente 0,1 ng/kg a 0,1 g/kg o de 10 ng/kg a aproximadamente 10 µg/kg de la proteína alimentaria alergénica modificada en el individuo al que se administra. Estas dosificaciones están destinadas a alérgenos modificados obtenidos de alérgenos purificados. Para los alérgenos modificados basados en un extracto bruto del alérgeno, las dosificaciones pueden ser mayores correspondiendo a la pureza del extracto utilizado.

Para el tratamiento de desensibilización típico, típicamente es necesario que el paciente reciba administraciones frecuentes, p. ej., inicialmente cada dos o tres días, reduciéndose gradualmente a una vez cada dos o tres semanas. Otros programas de desensibilización adecuados incluyen inyecciones subcutáneas una vez cada 2-4 semanas, la dosificación de las inyecciones pueden aumentar gradualmente durante un periodo de 3-6 meses y luego continuar cada 2-4 semanas durante un período de hasta aproximadamente 5 años.

Los protocolos de desensibilización pueden comprender también una forma de tratamiento convencionalmente conocida en diversas formas alternativas equivalentes como desensibilización rápida, inmunoterapia rápida con alérgenos, vacunación rápida con alérgenos e inmunoterapia rápida o urgente. En términos generales, este procedimiento trata de acercar un paciente alérgico a una dosis de extracto inmunizante o de mantenimiento (es decir, alérgeno) administrando una serie de inyecciones (o mediante otro portador adecuado) de dosis crecientes del alérgeno a intervalos frecuentes (p. ej., cada hora). Si tiene éxito, el paciente mostrará una resistencia mejorada al alérgeno, posiblemente incluso presentando una no-reactividad total a cualquier exposición alergénica posterior. En la técnica se conocen diversos protocolos de desensibilización y pueden comprender, por ejemplo, un método de tratamiento de un paciente que tiene una hipersensibilidad inmediata a un alérgeno utilizando un plan acelerado de inmunoterapia rápida en combinación con un método de pretratamiento de dicho paciente con antagonistas de prednisona e histamina antes de recibir la inmunoterapia acelerada tal como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 2003/082212.

Los alérgenos modificados o composiciones de la invención se pueden administrar a partir de una matriz de liberación controlada o sostenida insertada en el cuerpo del sujeto.

La invención se ilustrará ahora mediante lo siguiente.

Ejemplos

Materiales y métodos

Extracción de la proteína de la nuez de Brasil y cromatografía líquida

Las nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*) se adquirieron como nueces con cáscara de Imko Nut Products (Doetinchem, Países Bajos) y se almacenaron selladas al vacío a 10°C hasta su uso. Se molió un kilo de nueces de Brasil y se extrajo tres veces con éter de petróleo. Se extrajo una porción de 368 gramos de harina desgrasada con 3680L de acetato de sodio 20M, pH 5,5, durante 2 horas a temperatura ambiente controlada. Se desechó la fracción insoluble después de la centrifugación (30 minutos a 8000g). Se almacenó el extracto en porciones a -20°C.

Se aplicó una fracción de 2L a una columna Source S (volumen de columna de 300mL, Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Suecia) equilibrada con acetato de sodio 20mM, pH 5,5 (tampón de carga). Después de lavar la columna con el tampón de carga para eliminar la proteína no unida, la columna se eluyó con un gradiente de 3L de 0 a 1M de cloruro de sodio en tampón de carga. Las fracciones que contenían albúmina 2S se mezclaron y se almacenaron en pequeñas porciones para un solo uso a -20°C. Todos los tampones utilizados se filtraron sobre membranas de 0,45µ. Bajo condiciones no reductoras, la albúmina 2S purificada migra como una sola banda con una pureza estimada de >95% a aproximadamente 12kDa en SDS-PAGE (Figura 1). Se dializó la albúmina 2S purificada frente a agua desmineralizada, se liofilizó y se almacenó a -20°C.

Determinación de proteínas

Se midieron las concentraciones de proteína en extractos brutos utilizando el método de Bradford (BioRad, Hercules, CA) con albúmina de suero bovino como patrón. Las concentraciones de albúmina 2S purificada se determinaron midiendo la A280. Se utilizó un valor para A280 (1mg/mL) de 0,125, basado en el programa basado en la Web ProtParam de SwissProt (www.expasy.org/tools/protparam.html, código de secuencia AB044391).

Reducción y alquilación de la albúmina 2S

La proteína liofilizada (540mg) se disolvió en guanidinio 6M, NH_4HCO_3 100mM pH 7,8 (270mL; 2mg/mL) y luego la disolución se calentó a 56°C y se añadió ditiotreitól (DTT) (830mg; composición final 20M). Después de 60

min la proteína reducida se dejó enfriar a temperatura ambiente controlada y se añadió a la disolución de proteína agitada una disolución de yodoacetamida recién preparada (5,02g en 27mL, 100mM de NH_4HCO_3 pH 7.8, concentración final 100mM). Se permitió proceder a la alquilación durante 90 min. a temperatura ambiente controlada en la oscuridad. La proteína reducida y alquilada se dializó frente a agua desmineralizada (3 veces 10L) en un tubo de diálisis Spectro/Por 6 (1kDa cut off) a 4°C. Se disolvió la albúmina 2S de control (110g) en guanidinio 6M, NH_4HCO_3 100mM pH 7,8 (50mL, 2mg/mL), se calentó a 56°C, se enfrió a temperatura ambiente controlada y luego se dializó.

Tanto la albúmina 2S alquilada como el control se liofilizaron. La albúmina 2S alquilada (524mg, 97% de rendimiento) se obtuvo como un polvo denso cristalino ligeramente amarillo y se obtuvo la albúmina 2S de control (110 mg, 100%) como un polvo blanco esponjoso. Tanto la albúmina 2S alquilada como la de control se disolvieron (2mg/mL) en NH_4HCO_3 100 mM, pH 7,8. Se mezclaron cuatrocientos μL de disolución de proteína y 100 μL de disolución de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) o reactivo de Ellman, en NH_4HCO_3 50mM pH 7,8) y se midió la absorción a 405 nm después de 10 min de incubación a temperatura ambiente controlada. Como blanco se mezclaron 400 μL de tampon y 100 μL de disolución de DTNB. Se calculó el número de grupos -SH libres utilizando el coeficiente de extinción molar ($A_{405}=13260M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) del anión libre del ácido 5-tio2-nitrobenzoico (TNBS). La albúmina 2S reducida y alquilada mostró 0,01 grupos -SH libres por molécula, y en la preparación de control, no se pudieron detectar grupos -SH libres. La albúmina 2S reducida y alquilada muestra una subunidad grande y pequeña, a aproximadamente 9 y 3kDa, respectivamente (Figura 1). Esta preparación se simboliza además como albúmina RA-2S.

Se aislaron las cadenas pesadas y ligeras de la albúmina RA-2S utilizando cromatografía de exclusión por tamaño. Se disolvió la albúmina 2S reducida, alquilada y liofilizada en tampón fosfato de sodio 20mM que contenía NaCl 100mM. Se separaron la cadena pesada y ligera utilizando un Akta Explorer FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) equipado con una columna de filtración en gel de péptido SD-30 (475mL, Amersham-Pharmacia Biotech), calibrado con una mezcla de proteínas globulares y péptidos de masa conocida según la instrucción del fabricante de la columna. La separación se realizó por lotes (4mL, porciones de 10mg/mL) con una velocidad de flujo de 1mL/min y se monitorizaron las proteínas a 214nm.

Animales

Para los estudios de sensibilización se utilizaron durante estos estudios ratas macho juvenes Brown Norway (BN) (3-4 semanas de edad a la llegada) obtenidas de Charles River (Sulzfeld, Alemania). Durante el experimento y por lo menos 10 días antes de la iniciación del estudio, las ratas se alojaron en una sala de animales mantenida a $23\pm 3^\circ\text{C}$, con un ciclo luz/oscuridad de 12h y una humedad relativa de 30-70%. Los animales se alojaron en jaulas de Makrolon en grupos de cinco y tuvieron acceso a los alimentos y al agua del grifo ad libitum. Como se utilizó el principal alérgeno (*Ber e 1*) de la nuez de Brasil para los estudios de sensibilización, las ratas se reprodujeron y se criaron con una dieta de roedor sin nuez de Brasil comercialmente disponible (SDS Special Diet Service, LAD1 (E) SQC, Witham, Inglaterra). Para asegurar el uso de animales inmunológicamente inocuos con respecto a los antígenos bajo investigación, las muestras de sangre antes del estudio se ensayaron siempre para anticuerpos específicos de la nuez de Brasil. Todos los estudios en animales se aprobaron por un comité de ética independiente.

Protocolo de sensibilización

Para la sensibilización oral los animales (n=10) se expusieron a dosificación por sonda utilizando una aguja de alimentación animal de acero inoxidable de calibre 18 durante 6 semanas. Las ratas recibieron o albúmina 2S reducida/alquilada (albúmina RA-2S) o albúmina 2S nativa (0,1mg o 1mg de proteína/mL de agua del grifo; 1mL/animal) sin el uso de un adyuvante o sólo agua (controles). Se obtuvieron muestras de sangre del plexo orbital bajo anestesia suave de CO_2 el día 0 o mediante exanguinación de la aorta abdominal al sacrificio. Después de la coagulación durante 1h a temperatura ambiente controlada, las muestras de sangre se centrifugaron (Heraeus Minifuge T, Osterode, Alemania) durante 20 min. a 2.000g y 4°C para obtener los sueros. Los sueros se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta los análisis de los títulos de IgG1 e IgG2a específicos de la albúmina anti-nativa y RA-2S mediante Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) e IgE específica mediante el ensayo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA).

Se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) animales de control positivo (n=5) con 0,5mL de una disolución de albúmina 2S reducida y alquilada o nativa de 0,2mg/mL de disolución salina estéril los días 0, 2, 4, 7, 9 y 11. Para potenciar la respuesta inmune el día 0 se inyectaron 0,2mL de una suspensión de adyuvante de $\text{Al}(\text{OH})_3$ en 25mg/mL de disolución salina estéril mezclada con los 0,5mL de albúmina (RA)-2S. Los animales se desangraron el día 28 por exanguinación de la aorta abdominal. Los sueros se prepararon y se almacenaron como se ha descrito anteriormente.

Medida de los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos en suero

Se utilizaron técnicas de ELISA para medir anticuerpos específicos en suero para la albúmina 2S nativa y la albúmina RA-2S. Para la detección de IgG1 o IgG2 específicos frente a albúmina RA-2S o albúmina 2S nativa, se revistieron placas de microtitulación de 96 pocillos (de fondo plano, Maxisorp, NUNC, Roskilde, Dinamarca) durante

la noche a 4°C con 100µl/pocillo de una disolución de 5µg/mL de albúmina RA-2S o albúmina 2S nativa en tampón carbonato, pH 9,6. Las placas se lavaron tres veces con agua del grifo que contenía Tween 20 al 0,4% (Merck, Hohenbrunn, Alemania). A esto le siguió la adición de 100µl/pocillo de tampón fosfato salino (PBS) que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA, Sigma Chemicals Co., St. Louis, EE.UU.) y Tween 20 al 0,02% (PBS/BSA-Tween 20). Después de 1h de incubación a 37°C, se lavaron las placas y se añadieron a los pocillos diluciones en serie de suero de rata en PBS/BSA-Tween 20 y se incubaron durante 1h a 37°C. Después del lavado, se añadió 100µl/pocillo de anti rata IgG1 o IgG2a de ratón conjugado con peroxidasa en PBS/BSA-Tween 20 (Zy ed, San Francisco, EE.UU., diluido 1:500). Después de la incubación durante 1h a 37°C, las placas se lavaron de nuevo y se añadió una disolución de sustrato enzimático de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Chemicals Co., St. Louis, EE.UU., pocillo de 100µl y 6mg/mL de DMSO) Las placas se desarrollaron a temperatura ambiente controlada de 5 a 15 min. Finalmente, se añadió 100µl/pocillo de H₂SO₄ 2N. Las densidades ópticas se leyeron espectrofotométricamente a 450nm con un lector de placas ELISA (Microplate Reader, Bio-rad Laboratories, Richmond, EE.UU.). Se utilizó como control negativo una mezcla de presuero. El presuero mezclado se midió a una dilución de 1:4. La extinción media en los pocillos de control negativos, a los que se añadió tres veces la desviación estándar, proporcionó el valor de referencia tomado para determinar el título en los sueros de ensayo. Cada suero de ensayo se tituló comenzando con una dilución 1:4 y el recíproco de la dilución de suero más alejado se leyó como el título dando una absorbancia mayor que el valor de referencia. Todos los análisis se realizaron por duplicado. Se incorporaron muestras de control positivas y negativas para cada placa de 96 pocillos.

Medida de los anticuerpos IgE específicos en suero

Los sueros de rata se ensayaron para la IgE específica frente a albúmina (RA)-2S mediante ELISA. Para la detección de la IgE específica frente a albúmina (RA)-2S, se revistieron placas de microtitulación de 96 pocillos durante la noche a 4°C con 100µl/pocillo de anti rata IgE de ratón (MARE-1, Zymed, San Francisco, EE.UU.) a una concentración de 1,5µg/mL en tampón carbonato, pH 9,6. Se lavaron las placas y se añadió 100µl/pocillo de PBS/BSA-Tween 20.

Después de la incubación durante 1 hora a 37°C, se lavaron las placas y se añadieron muestras de suero de rata diluidas y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Se lavaron las placas y posteriormente se añadió 100µl/pocillo de una disolución de 1µg/mL de albúmina (RA)-2S-digoxigenina conjugada (DIG). La DIG se obtuvo de Boehringer (Mannheim, Alemania) y se realizó un acoplamiento a la albúmina (RA)-2S de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La albúmina (RA)-2S marcada se separó en una columna Sephadex G-25 (Boehringer, Mannheim, Alemania) y se determinó la eficiencia de marcaje espectrofotométricamente a 280 nm. La incubación con albúmina (RA)-2S-DIG se realizó durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, se añadieron 100µl/pocillo de fragmentos Fab anti-DIG de oveja conjugados con peroxidasa (Boehringer, Mannheim, Alemania) diluidos 1:3000 en PBS/BSA-Tween 20. Después de la incubación durante 1 hora a 37°C, las placas se lavaron de nuevo y se añadió una disolución de sustrato enzimático de TMB. El desarrollo de la placa, la medida y la elaboración del título fueron como se describe para la IgG1/IgG2a específica frente a albúmina (RA)-2S por ELISA

Medida de anticuerpos reagénicos por Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA)

Para el ensayo de PCA se utilizó el método como se ha descrito anteriormente por Ovary et al, Immunol. Methods (1964), 259-83. Las ratas intactas BN (no tratadas) se rasuraron en la espalda y costados y les inyectaron por vía intradérmica 0,1mL de los sueros de ensayo en diluciones en serie, seguido 64h después de una inyección intravenosa de 1mL de una mezcla 1:1 de una disolución de albúmina (RA)-2S o albúmina 2S nativa (5mg/mL de disolución salina estéril) y una disolución de azul de Evans (2% en disolución salina estéril). Después de 20-30 min., los animales se examinaron para respuestas positivas. Se midió el diámetro de la extravasación del colorante en el sitio de la inyección de suero. El título reagénico se leyó como el recíproco de la dilución más alejada, dando una mancha coloreada de al menos 5mm de diámetro. Los sueros de control positivos y negativos como los utilizados en ELISA se ensayaron simultáneamente con los sueros de ensayo en cada animal utilizados para los ensayos de PCA.

Resultados

Leyendas de las figuras

FIGURA 1.

SDS page de albúmina 2S y albúmina RA-2S.

Carril 1: Albúmina 2S nativa; Carril 2: albúmina RA-2S. Carril M muestra las proteínas marcadoras con peso molecular conocido (mostradas en el margen izquierdo, kDa).

FIGURA 2.

Títulos de IgG1 (€) e IgG2a específicos frente a albúmina 2S y albúmina 2S reducida/alquilada (albúmina RA-2S) (■) tras la dosis diaria intragástrica de las ratas BN (n=10) con agua, 0,1mg y 1mg de albúmina 2S, 0,1mg y 1mg de albúmina RA-2S por rata durante 28 (Figura 1A) o 42 días (Figura 1B), respectivamente. Se sensibilizaron varios

animales (n=5) intraperitonealmente o con albúmina 2S o albúmina RA-2S junto con alumbre como un adyuvante (Figura 1A). Los datos se presentan como media del $^2\log$ del título de $Ig\pm SD$ del número de ratas que responden por grupo. El porcentaje de animales que desarrollan una respuesta $IgG1$ o $IgG2a$ en los respectivos intervalos de tiempo se indica en las barras.

5 FIGURA 3.

Títulos de IgE específico frente a albúmina 2S y albúmina 2S reducida/alquilada (albúmina RA-2S) tras la dosis diaria intragástrica de las ratas BN (n=10) con agua, 0,1mg y 1mg de albúmina 2S, 0,1mg y 1mg de albúmina RA-2S por rata durante 42 días o después de sensibilización parenteral con alumbre como un adyuvante (n=5) o con albúmina 2S o albúmina RA-2S (suero del día 28), respectivamente. Los datos se presentan como media del $^2\log$ del título de $Ig\pm SD$ del número de ratas que responden por grupo. El porcentaje de animales que desarrollan una respuesta de IgE en los respectivos intervalos de tiempo se indica en las barras.

FIGURA 4.

IgE específica frente a albúmina 2S y albúmina RA-2S medido por los ensayos de anafilaxia cutánea pasiva tras la dosis diaria intragástrica de las ratas BN (n=10) con agua, 0,1mg y 1mg de albúmina 2S, 0,1mg y 1mg de albúmina RA-2S por rata durante 42 días, respectivamente. Se sensibilizaron varios animales (n=5) intraperitonealmente o con albúmina 2S o albúmina RA-2S junto con alumbre como un adyuvante. Las muestras de suero fueron del último día de la administración por sonda o 28 días después de la dosis i.p. Los símbolos (\square) indican ratas individuales. Los datos se dan como el diámetro individual del habón medido en cms.

Niveles de $IgG1$ e $IgG2a$ específicos en suero

Se determinaron los niveles de anticuerpos $IgG1$ e $IgG2a$ específicos en suero frente a albúmina RA-2S o a albúmina 2S nativa en los sueros de los días 28 y 42 (o el día 28 sólo en el caso de sensibilización parenteral) utilizando la técnica ELISA (Figura 2A+B). Las muestras de sangre antes del estudio fueron negativas para todos los animales. Estos sueros se mezclaron y se utilizaron como control negativo en el ensayo de ELISA y PCA. En general, el 70% de los animales expuestos oralmente a 1mg de albúmina 2S nativa/rata/día, desarrollaron respuestas $IgG1$ e $IgG2a$ específicas frente a albúmina 2S nativa los días 28 y 42, mientras que la exposición oral a 1mg de albúmina RA-2S dio como resultado un número menor de los animales que respondían 10 y 20% los días 28 y 50 y 60% al día 42 para las $IgG1$ e $IgG2a$ específicas frente a albúmina RA-2S, respectivamente. La dosis con una menor cantidad de proteína dio como resultado diferencias aún más sorprendentes. La exposición oral de los animales a 0,1mg de albúmina 2S nativa dio como resultado respuestas para las $IgG1$ e $IgG2a$ específicas frente a albúmina 2S nativa en el 50% de los animales, mientras que no se observaron respuestas de $IgG1$ o $IgG2a$ específicas en los animales dosificados oralmente con 0,1mg de albúmina RA-2S ambos días 28 y 42.

Al día 28, la exposición parenteral de los animales a la albúmina 2S nativa dio como resultado el desarrollo de respuestas de $IgG1$ e $IgG2a$ específicas frente a albúmina 2S muy pronunciadas en todos los animales. La exposición parenteral a la albúmina RA-2S dio como resultado respuestas de $IgG1$ e $IgG2a$ específicas frente a albúmina RA-2S en el 80% de los animales.

Niveles de IgE específica en suero

Se determinaron los niveles en suero de IgE específica frente a la albúmina RA-2S o a la albúmina 2S nativa en los sueros de los días 28 (sensibilización parenteral) y 42 (sensibilización oral) utilizando la técnica ELISA (Figura 3). Las muestras de sangre antes del estudio fueron negativas para todos los animales. Estos sueros se mezclaron y se utilizaron como control negativo en el ensayo de ELISA y PCA. Como se muestra en la figura 3, tanto la exposición oral (0,1 ó 1mg de proteína/rata/día) como la parenteral de los animales a la albúmina RA-2S no dio como resultado el desarrollo de anticuerpos IgE específicos frente a la albúmina RA-2S. Por el contrario, la dosificación oral de los animales o a 0,1mg o a 1mg de albúmina 2S nativa dio como resultado respuestas de IgE específicas frente a albúmina 2S en el 50% de los animales. La exposición parenteral a la albúmina 2S nativa indujo respuestas de IgE específicas frente a la albúmina 2S en todos los animales ensayados.

Niveles de anticuerpos reagínicos

Se determinó la presencia de niveles de anticuerpos reagínicos específicos frente a albúmina RA-2S y a albúmina 2S nativa en sueros no diluidos el día 42 o el día 28 en caso de sensibilización parenteral, utilizando ensayos de anafilaxia cutánea pasiva. Como se muestra en la figura 4, tanto la exposición oral (0,1 o 1mg de proteína/rata/día) como la parenteral de los animales a la albúmina RA-2S no dio como resultado el desarrollo de anticuerpos reagínicos específicos frente a albúmina RA-2S. Por el contrario, la dosificación oral de los animales o a 0,1mg o a 1mg de albúmina 2S nativa dio como resultado respuestas de anticuerpos reagínicos específicos frente a albúmina 2S en el 50% de los animales. La exposición parenteral a la albúmina 2S nativa indujo respuestas de anticuerpos reagínicos específicos frente a albúmina 2S en todos los animales ensayados.

Discusión

- Los presentes resultados muestran que la reducción de los enlaces disulfuro de la albúmina 2S de la nuez de Brasil disminuye el potencial sensibilizante de la albúmina 2S en el modelo de alergia alimentaria de la rata Brown Norway. La exposición oral a la albúmina RA-2S no dio como resultado el desarrollo de IgE específica contra la albúmina RA-2S en ninguno de los animales expuestos indicando una pérdida del potencial alergénico de la albúmina RA-2S determinada tanto por ELISA como por PCA. La administración oral de albúmina 2S nativa dio como resultado el desarrollo de una respuesta en la rata de IgG1 específica frente a albúmina 2S mediada por T helper-1 e IgG2a e IgE específicas frente a albúmina 2S mediada por T helper-2. El potencial alergénico de la albúmina RA-2S se redujo pero la capacidad inmunógena de la proteína todavía existía, aunque en un nivel más bajo comparado con la albúmina 2S nativa, ya que se formaron anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos contra la albúmina RA-2S.
- La dosificación de los animales con la dosis baja de albúmina RA-2S (0,1mg de proteína/rata/día) no dio como resultado en absoluto una respuesta de anticuerpos en las ratas mientras que la misma dosis de albúmina 2S nativa indujo respuestas de IgG1, IgG2a e IgE específicas, indicando de nuevo una menor capacidad inmunógena. La dosificación de 1mg de albúmina RA-2S dio como resultado respuestas de IgG1 e IgG2a específicas en las ratas aunque el inicio de la respuesta se retrasó en comparación con los animales tratados con 1mg de albúmina 2S nativa. El aumento de la dosis de albúmina RA-2S podría haber dado como resultado una sensibilización alérgica de los animales, ya que se sabe que varios aspectos determinan el posible potencial alergénico de una proteína en los modelos animales, que incluyen la edad de la primera exposición, la vía de exposición, la duración y la magnitud de exposición.
- Tomados en conjunto, estos datos muestran que la reducción de los enlaces disulfuro de la albúmina 2S da como resultado la pérdida del potencial alergénico y un aumento de la sensibilidad a la digestión.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Alérgeno alimentario modificado, en donde el alérgeno alimentario se modifica por reducción y alquilación y en donde se rompen esencialmente todos los enlaces disulfuro en el alérgeno alimentario, para uso en el tratamiento de un individuo que padece o que tiene tendencia a desarrollar una alergia alimentaria, dicho tratamiento comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho alérgeno alimentario modificado, en donde el alérgeno alimentario es una proteína alimentaria alergénica.
2. Alérgeno alimentario modificado para uso según la reivindicación 1, en donde el alérgeno alimentario es una proteína de almacenamiento de semillas.
- 10 3. Alérgeno alimentario modificado para uso según la reivindicación 2, en donde la proteína de almacenamiento es una albúmina 2S, una proteína de transferencia de lípidos (LTP) o una conglutinina.
4. Alérgeno alimentario modificado para uso según la reivindicación 3, en donde la proteína de almacenamiento es una albúmina 2S de un fruto seco o de semilla.
5. Alérgeno alimentario modificado para uso según la reivindicación 4, en donde la proteína de almacenamiento es albúmina 2S de la nuez de Brasil.
- 15 6. Alérgeno alimentario modificado para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alérgeno alimentario se modifica por reducción utilizando un agente reductor elegido del grupo 2-mercaptoetanol, ditioneitol, ditioeritritol, tributilfosfina y una combinación de los mismos.
- 20 7. Alérgeno alimentario modificado para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alérgeno alimentario se modifica por alquilación utilizando un agente alquilante elegido del grupo de N-etilmalimida, cistamina, yodoacetamida, ácido yodoacético y combinaciones de los mismos.
8. Alérgeno alimentario modificado para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alérgeno alimentario modificado se administra en forma de una forma de dosificación elegida del grupo de una cápsula, comprimido, pastilla, grageas, píldoras, gotitas, supositorio, aerosol , polvo, aerosol, vacuna, ungüento, pasta, crema, inhalante o parche.
- 25 9. Alérgeno alimentario modificado para uso según la reivindicación 8, donde la forma de dosificación comprende además un portador farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante.
10. Alérgeno alimentario modificado para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alérgeno alimentario modificado se administra por vía oral, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intramuscular, pulmonar o por vía mucosa.
- 30 11. Un alérgeno alimentario modificado por reducción y alquilación en donde esencialmente todos los enlaces disulfuro en dicho alérgeno alimentario están rotos, en donde el alérgeno alimenticio es una proteína alimentaria alergénica.
12. Una composición farmacéutica que comprende un alérgeno alimentario según la reivindicación 11.

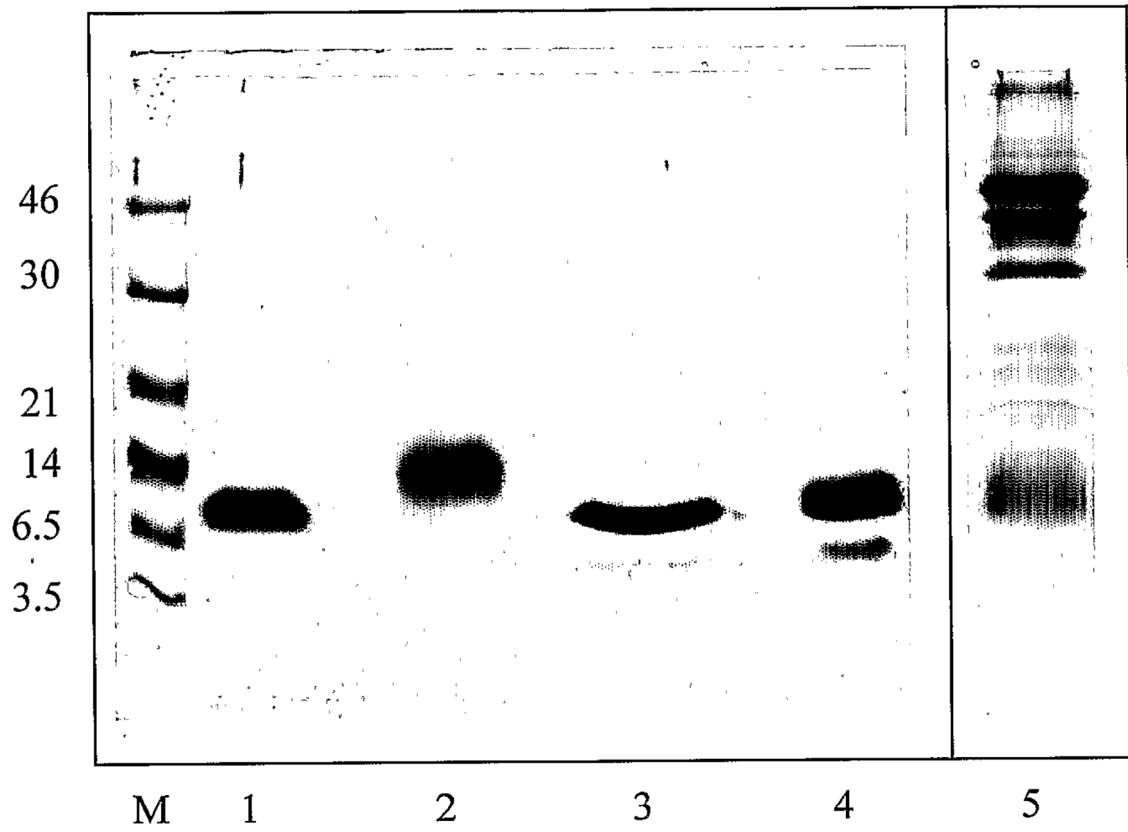
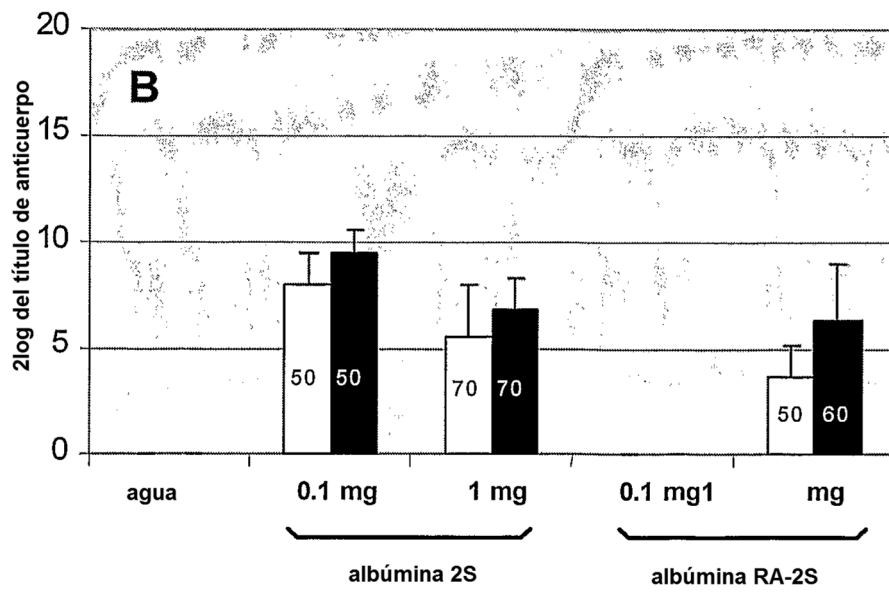
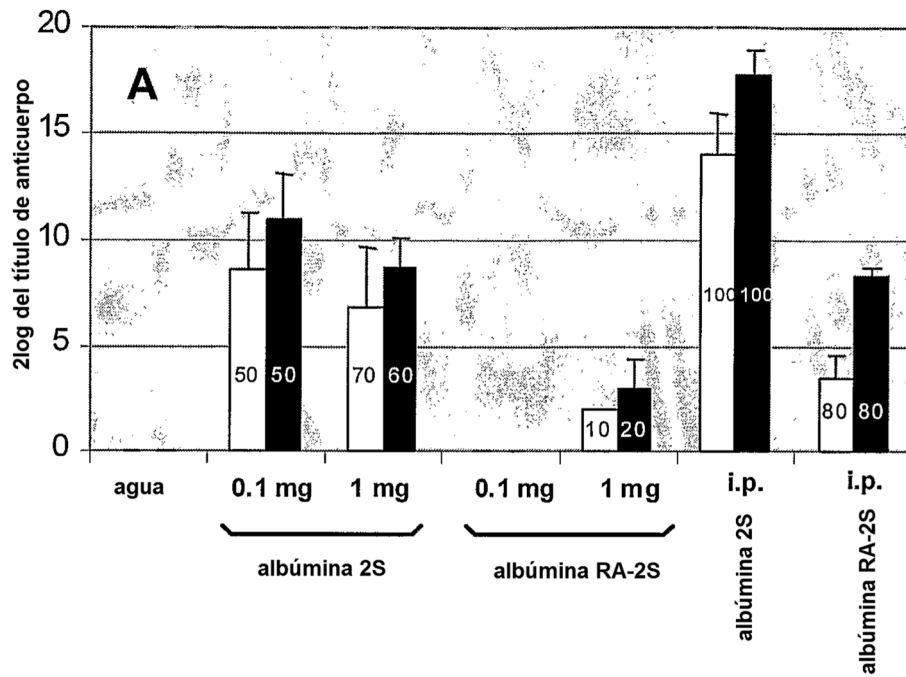


Fig. 1

Fig. 2



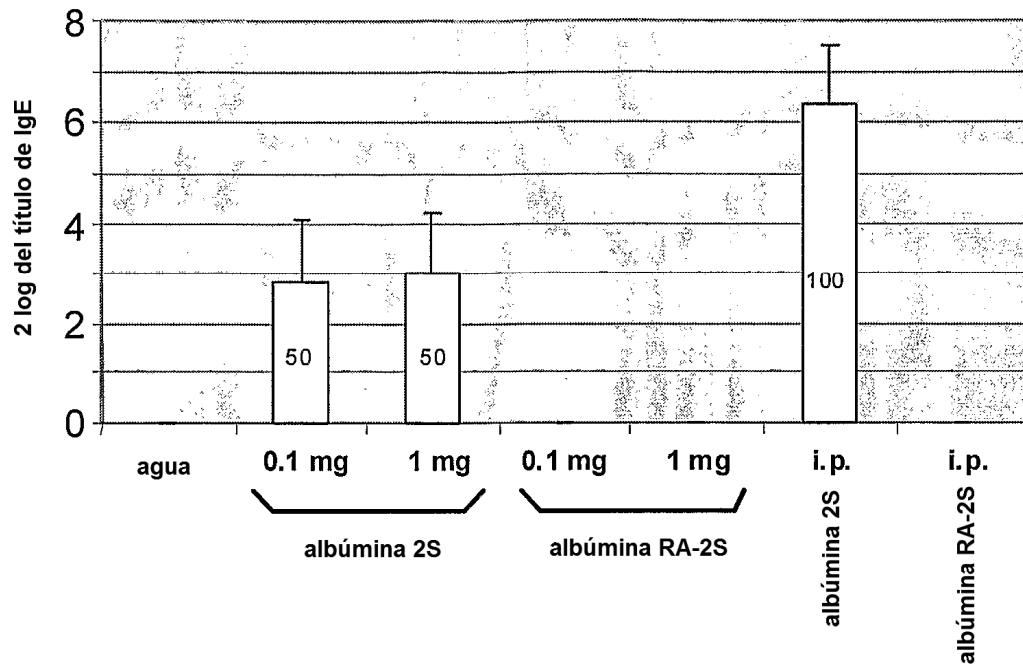


Fig. 3

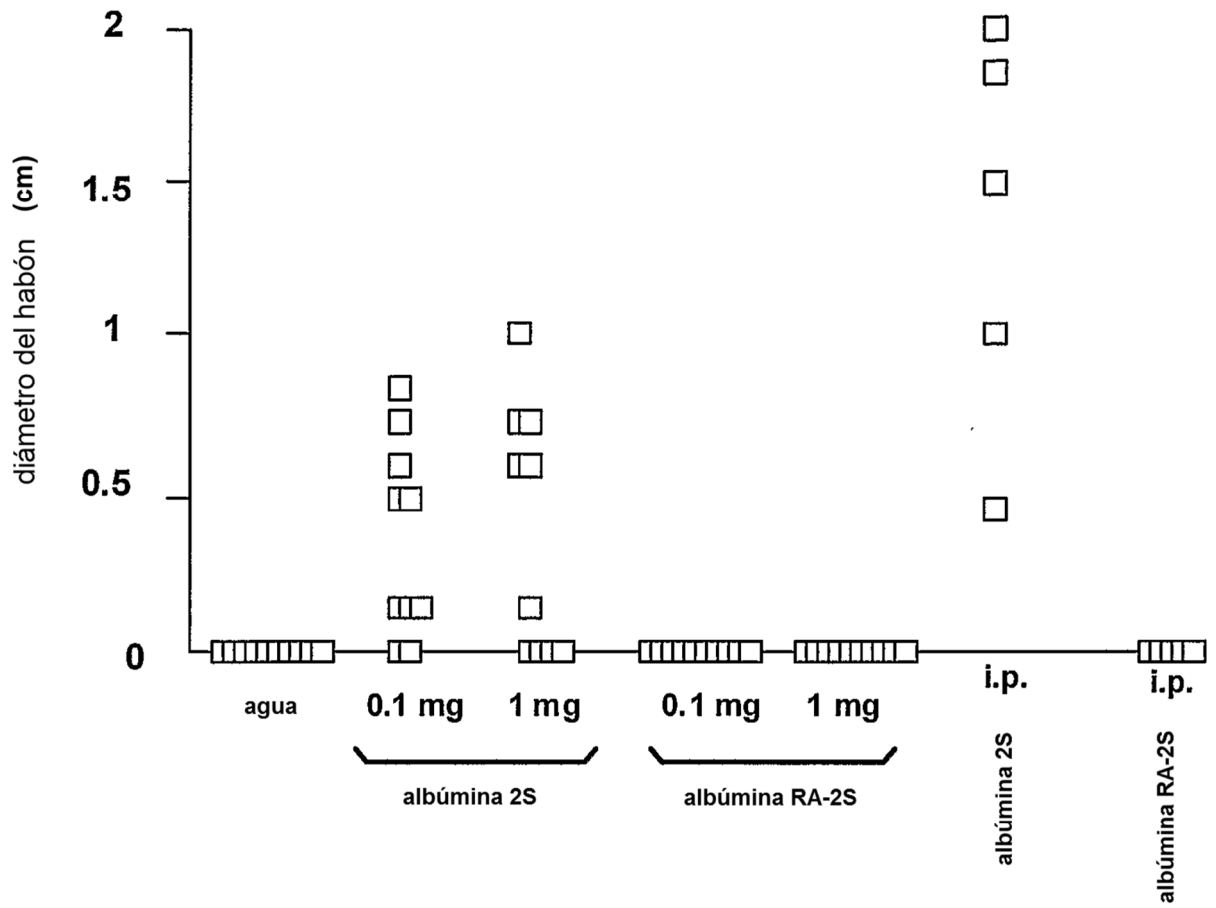


Fig. 4