

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 550**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/35** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 38/21** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2013 PCT/GB2013/052316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037717**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2013 E 13763273 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2892556**

54 Título: **Composiciones y métodos relacionados con el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

**05.09.2012 GB 201215873**

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

**10.12.2019**

73 Titular/es:

**ALFACYTE LTD (100.0%)  
Biocity Scotland, Bo'ness Road, Newhouse,  
Lanarkshire  
ML1 5UH , GB**

72 Inventor/es:

**STIMSON, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 734 550 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

Composiciones y métodos relacionados con el tratamiento de enfermedades

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para estimular la inducción de una respuesta inmunológica mediada por células (tal como la mediada por células Th1) y la supresión de una respuesta inmunológica humoral o alérgica (tal como la mediada por células Th2 y Th17). En particular, la invención se refiere a composiciones y métodos para prevenir y tratar la alergia, tal como la alergia alimentaria, y enfermedades alérgicas asociadas, y trastornos en los que una respuesta de Th17 exagerada desempeña un papel perjudicial. La invención se extiende además al uso de las composiciones de la invención en el tratamiento y/o la profilaxis de la alergia y enfermedades alérgicas asociadas.

### Antecedentes de la invención

15 Las citoquinas son proteínas inmunomoduladoras que median en la activación y las respuestas del sistema inmunológico, tales como las respuestas humorales de tipo alérgico y la inmunidad mediada por células. Los linfocitos T (células T), que son una fuente importante de citoquinas, poseen receptores específicos de antígeno (el receptor de células T) sobre su superficie celular, que permite el reconocimiento de antígenos extraños. Existen dos subconjuntos principales de linfocitos T, que se distinguen por la presencia de marcadores de la superficie celular conocidos como CD4 y CD8. Los linfocitos T que expresan CD4 también se conocen como células T auxiliares, y estas se consideran los productores de citoquinas más prolíficos. Este subconjunto puede subdividirse en células Th1 y células Th2/Th17, y las citoquinas que producen se conocen como citoquinas de tipo Th1 y citoquinas de tipo Th2/Th17, respectivamente.

20 Las células Th1 se caracterizan por la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$ . Las células Th1 están implicadas en la inmunidad mediada por células ("cell-mediated immunity", CMI), que es la respuesta inmunológica generada habitualmente contra virus y patógenos intracelulares. La respuesta mediada por células también elimina las células cancerosas y estimula las reacciones de la piel de hipersensibilidad de tipo retrasado ("delayed-type hypersensitivity", DTH).

25 Las células Th2 se caracterizan por la producción de interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5), interleuquina-9 (IL-9), interleuquina-10 (IL-10) e interleuquina-13 (IL-13). Se cree que las células Th2 desempeñan un papel en las respuestas alérgicas. Las citoquinas, tales como IL-4, en general estimulan la producción de anticuerpos (la "respuesta inmunológica humoral") dirigidos contra organismos extracelulares, tales como parásitos. La IL-5 estimula las respuestas de eosinófilos, que también son parte de la respuesta inmunológica a grandes parásitos extracelulares.

30 Las células Th17 segregan IL-17 y están implicadas en la regulación inmunológica en el cáncer y las reacciones alérgicas. Desde el punto de vista funcional, las células Th17 desempeñan un papel en la defensa del hospedante frente a patógenos extracelulares mediando en el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos hacia los tejidos infectados. Por tanto, son parte importante de la respuesta humoral, junto con las células Th2. La identificación de la familia Th17 de células T efectoras ha representado un gran avance reciente. La familia de citoquinas IL-17 es un grupo de citoquinas que incluye IL-17A, B, C, D, IL-17E (IL-25) e IL-17F. Cada vez más se reconoce que, además de las células T, otras células, tales como las células NK y los neutrófilos, también pueden ser una fuente importante de IL-17. Además de IL-17A, la principal citoquina producida por las células Th17, estas células también liberan IL-17F, IL-21 e IL-22.

35 Se ha establecido la hipótesis de que, en ciertas circunstancias, la respuesta de Th1 o la respuesta de Th2/Th17 puede provocar enfermedades. Una respuesta de Th1 suprarreactiva puede generar una enfermedad autoinmunitaria específica de órgano, tal como artritis, esclerosis múltiple, o diabetes de tipo I, mientras que una respuesta de Th2/Th17 suprarreactiva puede establecer las bases de una alergia y atrofia. En la actualidad, se cree que las células Th17 desempeñan un papel principal en la defensa del hospedante frente a patógenos, y una respuesta de Th17 exagerada puede conducir a graves respuestas inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias: las enfermedades inflamatorias del intestino ("inflammatory bowel diseases", IBD), concretamente, colitis ulcerosa ("ulcerative colitis", UC) y enfermedad de Crohn ("Crohn's disease", CD), son procesos inflamatorios crónicos del tracto gastrointestinal. En estas enfermedades, una respuesta inmunológica alterada y exagerada, principalmente hacia la microflora endógena, desempeña un papel principal. La expresión de IL-17 aumenta en UC y CD. Los IFN de tipo I se han estudiado en ensayos clínicos en pacientes con UC y han demostrado eficacia en estudios seleccionados. Como citoquinas antivíricas, ahora se sabe que los IFN de tipo I pueden regular el desarrollo de las células Th17.

40 Tanto la respuesta de Th1 como la respuesta de Th2/Th17 pueden infrarregularse entre sí, y esta es la base de la denominada hipótesis de "Th1/Th2", por la cual una respuesta inmunológica puede desviarse hacia la vía de Th1 o Th2/Th17, y esto está regido por el perfil de citoquinas segregadas por un grupo de células, que puede estimular la expansión de ese tipo de células y restringir la expansión del tipo de células opuesto.

Los interferones (IFN) son una familia de proteínas que son efectores pleiotrópicos del sistema inmunológico. Los interferones pueden clasificarse en tres tipos diferenciados: interferones de tipo I, interferones de tipo II e interferones de tipo III. Los IFN de tipo I representan una familia de citoquinas muy homólogas que se ha descubierto que activan una gama de respuestas fisiológicas, que incluyen actividades antivíricas y antiproliferativas, así como desempeñan un papel importante como activadores de la respuesta inmunológica.

Los interferones de tipo I consisten en interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón beta (IFN- $\beta$ ), interferón kappa (IFN- $\kappa$ ), interferón tau (IFN- $\tau$ ), interferón nu (IFN- $\nu$ ) e interferón omega (IFN- $\omega$ ). El IFN- $\alpha$  está representado en el genoma por 13 genes (12 subtipos), algunos de los cuales presentan variantes alélicas, y los diferentes productos del gen de IFN- $\alpha$  se denominan subtipos. Todos los subtipos de interferones consisten en 166 aminoácidos estabilizados por dos enlaces disulfuro, excepto para el IFN- $\alpha$ 2, que tiene un aminoácido menos. La homología con el IFN- $\alpha$  de ratón es del 40%.

Existen 2 formas de IFN- $\alpha$ : (i) IFN alfa recombinantes, que se denominan IFN- $\alpha$ 2a e IFN- $\alpha$ 2b, con solo una diferencia en un aminoácido (IFN- $\alpha$ 2a ha sido clonado a partir de una línea de células tumorales y aparece como un variante polimórfico en poblaciones humanas); y (ii) un IFN- $\alpha$  de múltiples subtipos, a veces denominado IFN alfa natural, que se expresa a partir de la fracción de leucocitos de la sangre humana expuestos al virus Sendai o es producido por líneas de células, por ejemplo, linfoblastoides. Este producto se purificado casi totalmente con una etapa de inmunofinidad final, y contiene seis subtipos principales, concretamente, IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\alpha$ 8, IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14, e IFN- $\alpha$ 21, siendo los dos primeros los componentes principales.

Se sabe que diferentes patógenos inducen diferentes subtipos de IFN- $\alpha$  *in vitro*, y que los subtipos de IFN- $\alpha$  tienen diferentes actividades antivíricas. Se ha demostrado que una infección a través de una diversidad de vías, que incluyen la vía oral, induce diferentes perfiles de subtipos. Los subtipos de IFN- $\alpha$  se unen al mismo receptor, activan vías de señalización comunes y se espera que tengan las mismas funciones biológicas. De modo similar a muchas citoquinas, dos de los subtipos de IFN- $\alpha$  naturales están glicosilados. El IFN- $\alpha$ 14 presenta una glicosilación N-enlazada, mientras que el IFN- $\alpha$ 2 presenta una glicosilación O-enlazada. La glicosilación influye en la estructura y la polarización de la molécula, pero no se han demostrado efectos sobre la unión a receptores ni una función fisiológica directa. No obstante, la glicosilación puede modular el reconocimiento por el sistema inmunológico o aumentar la semivida en la circulación.

Todos los subtipos de IFN- $\alpha$  tienen actividades antivíricas por definición, aunque su eficacia absoluta en este contexto puede variar considerablemente. Además, se han descrito muchas otras propiedades biológicas, pero con potencias variables, que incluyen actividades inmunomoduladoras y antiproliferativas. Parece que los efectos pleiotrópicos son debidos a una interacción diferencial con las cadenas del receptor y la señalización a través de diferentes vías intracelulares a una gama de moléculas efectoras.

De forma global, el IFN- $\alpha$  es parte de la inmunidad innata, con fuertes conexiones con la inmunidad adaptativa. Se activan tanto células T como células B. El IFN- $\alpha$  estimula la inducción de una respuesta inmunológica de Th1, siendo un mecanismo probable a través de la potenciación de la expresión de la proteína 10 inducible por IFN- $\alpha$  ("IFN- $\alpha$ -inducible protein-10", IP-10) en células dendríticas. Unos pocos estudios tratan del papel de los subtipos en la regulación de las células T auxiliares, al mismo tiempo que la actividad citolítica de las células T y las células NK se potencia.

El IFN- $\alpha$  puede desempeñar un papel clave en la regulación de la respuesta de Th1. Se ha demostrado que el tratamiento con IFN- $\alpha$  estimula la diferenciación de las células Th1 de modo indirecto (principalmente a través de IFN- $\gamma$ ), pero también parece que reprime el desarrollo de las células Th2 a través de la supresión de la expresión de los genes de IL-4 e IL-13. Por tanto, el IFN- $\alpha$  es capaz de reestablecer un equilibrio de poblaciones de Th1/Th2 en enfermedades e infecciones que estimulan un desequilibrio de células Th2. En años recientes, ha resultado evidente que, además de sus efectos antivíricos, el IFN- $\alpha$  ejerce varias funciones inmunomoduladoras. El IFN- $\alpha$  puede tener un impacto en la diferenciación de las células dendríticas y controla la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias, tales como IL-8 o IL-18, e induce varios mediadores antiinflamatorios, tales como el antagonista del receptor de IL-1 ("IL-1 receptor antagonist", IL-1Ra), el receptor de TNF soluble p55, y la proteína de unión a IL-10 e IL-18. Sin embargo, los mecanismos de acción del IFN- $\alpha$  aún no se entienden por completo.

En pacientes con alergia o enfermedades alérgicas, se genera una respuesta inmunológica de Th2 predominante. Las células Th2 segregan IL-4 e IL-13, impulsando a las células B para que produzcan anticuerpos de inmunoglobulina E (IgE) específicos para un alérgeno. Un alérgeno es un antígeno capaz de estimular una reacción de hipersensibilidad de tipo I en individuos atópicos, principalmente a través de respuestas mediadas por inmunoglobulina E (IgE). Después de esto, la IgE se une con su receptor de alta afinidad sobre células cebadas, células de la piel y tejidos mucósicos. Tras exponerse al alérgeno, las células cebadas liberan su contenido, que incluye histamina, leucotrienos y prostaglandinas. Esto provoca síntomas alérgicos que incluyen, pero no se limitan a enrojecimiento de los ojos, picores, rinorrea, eccema, urticaria, angioderma, falta de aliento, sibilancia, tos, un ataque de asma, dolor abdominal, vómitos, diarrea o incluso anafilaxis.

Las enfermedades alérgicas están entre las formas más habituales de enfermedad crónica. La Organización Mundial de la Salud calcula que más del 20% de la población mundial está afectada, y solo en Europa existen más de 80

millones de individuos que las sufren (Global Allergy and Asthma European Network, 2008). Una reacción alérgica habitualmente está provocada por la hipersensibilidad del sistema inmunológico a un alérgeno, que provoca una respuesta inmunológica en una dirección errónea. Las alergias suaves, tales como la fiebre del heno, son muy habituales en la población humana. Las alergias graves pueden estar provocadas por alérgenos de la dieta, tales como alimentos, por alérgenos ambientales, tales como el veneno de insectos que pican, por medicaciones o pueden estar determinadas genéticamente.

La alergia alimentaria es un importante problema sanitario que se calcula que afecta a aproximadamente 6% de niños y 3-4% de adultos en las sociedades occidentales. Se ha establecido la hipótesis de que la alergia alimentaria surge de una anomalía en la tolerancia oral a antígenos o alérgenos ingeridos. Las alergias alimentarias y las enfermedades alérgicas asociadas incluyen, pero no se limitan a alergia a productos lácteos (leche), que incluye el síndrome de Heiner, alergia al huevo, alergia a la soja, alergia al pescado (marisco), alergia a los cacahuets y nueces de árboles, alergia al sésamo y otras semillas, alergia al gluten (trigo) y cereales, alergia a frutas y verduras, alergia a la cafeína, síndrome de alergia oral, alergia al alcohol, síndrome de alergia a los alimentos con polen, gastroenteritis eosinófila, alergia alimentaria gastrointestinal mediada por IgE y deficiencia en C1 esterasa.

La gestión y el tratamiento de las enfermedades alérgicas se realiza habitualmente a través de tres estrategias generales: (i) evitar el antígeno; (ii) medicaciones que se dirigen a los síntomas de la enfermedad, y (iii) inmunoterapia convencional, conocida como desensibilización, cuyo objetivo es potenciar la respuesta de Th1 en la enfermedad establecida. Sin embargo, estas estrategias ni se aproximan a ser ideales. No siempre es posible evitar los alérgenos, las medicaciones que se dirigen a los síntomas de la enfermedad, tales como antihistaminas, proporcionan solo un alivio a corto plazo, y la desensibilización implica el uso del alérgeno real, lo cual puede provocar efectos secundarios perjudiciales potencialmente frecuentes. La posibilidad de una anafilaxis nunca se elimina por completo en pacientes que padecen enfermedades alérgicas, y esto provoca una gran cantidad de estrés en el paciente y sus familias.

El documento WO2006/111745 describe el interferón alfa 14 para su uso en el tratamiento de infecciones víricas.

El documento WO2002/095067 describe el interferón alfa 14 mutante para su uso en el tratamiento de diversos trastornos.

El documento WO2005/123112 describe el uso del interferón alfa como inmunoadyuvante para potenciar la respuesta inmunológica a una vacuna contra infecciones o una vacuna anticáncer.

El documento US6.436.391 describe el uso del interferón alfa 14 y/o interferón alfa 8 como adyuvante de vacuna para estimular la proliferación de linfocitos B.

El presente inventor aduce que sería deseable desarrollar una estrategia inmunoterapéutica que implique un uso más seguro de un alérgeno, puesto que pueden emplearse dosis menores, y que proporcione una protección más a largo plazo frente a la reacción alérgica. Puesto que la alergia es el resultado de una suprarreactividad de las células Th2/Th17 y una correspondiente falta de actividad de la respuesta de Th1, una medicación que pueda modificar y equilibrar la respuesta de Th2 /Th17 en una dirección errónea sería beneficiosa para prevenir la reacción alérgica. Esta medicación también sería adecuada para tratar enfermedades y trastornos en los que una respuesta de Th17 exagerada desempeña un papel, tal como IBD.

### Sumario de la invención

Después de una intensa fase de experimentación, el presente inventor ha realizado el sorprendente descubrimiento de que la administración de un subtipo de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) específico, seleccionado de IFN- $\alpha$ 14, con una vacuna, por ejemplo, que comprenda un alérgeno, puede dar como resultado la activación potenciada de la respuesta inmunológica de Th1 y la represión de la respuesta inmunológica de Th2/Th17, y esto conduce a la identificación por parte del inventor de composiciones terapéuticas mejoradas que tienen utilidad en el tratamiento y/o la profilaxis de la alergia y las enfermedades alérgicas y de enfermedades y trastornos en los que una respuesta de Th17 exagerada desempeña un papel. En particular, el inventor ha identificado que la administración de al menos un alérgeno alimentario que es capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17 con IFN- $\alpha$ 14 puede usarse en el tratamiento de la alergia alimentaria y las enfermedades alérgicas asociadas.

Se proporciona un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, comprendiendo dicho método la etapa de:

(i) administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos.

El método incluye una etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de vacuna para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17. La composición de vacuna puede administrarse de modo secuencial, por separado o simultáneamente con al menos un subtipo de interferón alfa.

5 La composición de vacuna comprende al menos un antígeno. La composición de vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17, por ejemplo, un alérgeno alimentario. El método incluye, por tanto, una etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17, por ejemplo, un alérgeno alimentario. El alérgeno puede administrarse de modo secuencial, por separado o simultáneamente con al menos un subtipo de interferón alfa.

Generalmente, el sujeto es un mamífero, en particular un ser humano. El sujeto padece un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17.

10 Se proporciona al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17.

15 Dicho al menos un subtipo de interferón alfa se proporciona para la administración simultánea, por separado o secuencial con una composición de vacuna para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17. Dicho al menos un subtipo de interferón alfa se proporciona para la administración simultánea, por separado o secuencial con al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17 contra él, por ejemplo, un alérgeno alimentario.

20 Se proporciona el uso de al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17.

25 Dicho al menos un subtipo de interferón alfa se proporciona para la administración simultánea, por separado o secuencial con una composición de vacuna para el tratamiento o la profilaxis del trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17. Dicho al menos un subtipo de interferón alfa se proporciona para la administración simultánea, por separado o secuencial con al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17 contra él, por ejemplo, un alérgeno alimentario.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende:

30 (i) una vacuna para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17; y

35 (ii) el interferón alfa de subtipo IFN- $\alpha$ 14 para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17; en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria y una alergia o un trastorno alérgico asociado; y en la que la vacuna se proporciona de modo secuencial, por separado o simultáneamente con el IFN- $\alpha$ 14.

En ciertas realizaciones, la vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17, por ejemplo, un alérgeno alimentario.

40 También se describe una composición farmacéutica para potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, en la que la composición comprende una vacuna para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, y al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17, por ejemplo, un alérgeno alimentario.

50 En otro aspecto, la presente invención se extiende a mejoras en la eficacia de vacunas, por ejemplo, vacunas de enfermedades alérgicas o antialergias. Una composición que comprende una vacuna para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, tal como al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17, y al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 14, ha sido identificada de modo sorprendente por el inventor como que proporciona una composición inesperadamente eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades, tales como la alergia o enfermedades alérgicas asociadas.

También se describe una composición de vacuna que comprende:

(i) una vacuna para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17; y

(ii) al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos.

5 La vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17, por ejemplo, un alérgeno alimentario.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición de vacuna para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la alergia, en la que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, comprendiendo dicha composición de vacuna:

10 (i) al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17;

y (ii) al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 14.

También se describe el uso de una composición de vacuna que comprende al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17, y al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la alergia o enfermedades alérgicas asociadas.

15

También se describe un método para el tratamiento y/o la profilaxis de la alergia o enfermedades alérgicas asociadas, comprendiendo dicho método la etapa de:

(i) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de vacuna o una composición inmunogénica que comprende al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17, y al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, a un sujeto que lo necesita.

20

Se proporciona un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno mediado por la expresión potenciada de IL-17, comprendiendo dicho método la etapa de:

(i) administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos.

25

Se proporciona al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno mediado por la expresión potenciada de IL-17.

Se proporciona el uso de al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno mediado por la expresión potenciada de IL-17.

30

Se proporciona un método para modular una respuesta inmunológica, comprendiendo dicho método la etapa de:

(i) administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos.

35 Se proporciona al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, para su uso en la modulación de una respuesta inmunológica.

Se proporciona el uso de al menos un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, en la preparación de un medicamento para modular una respuesta inmunológica.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención indicados anteriormente, dicho al menos un subtipo de interferón alfa se proporciona para la administración simultánea, por separado o secuencial con una vacuna para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, por ejemplo, una vacuna para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno mediado por la expresión potenciada de IL-17, por ejemplo, una enfermedad o trastorno inflamatorio o una enfermedad autoinmunitaria, tal como la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), la colitis ulcerosa (UC) o la enfermedad de Crohn (CD). En ciertas realizaciones, la composición de vacuna comprende al menos un antígeno. En ciertas realizaciones, la vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17 contra él, por ejemplo, un alérgeno alimentario.

40

En ciertas realizaciones, dicho al menos un subtipo de IFN- $\alpha$  comprende, consiste o es IFN- $\alpha$ 14. En ciertas realizaciones, dicho al menos un subtipo de IFN- $\alpha$  comprende, consiste o es una forma recombinante de IFN- $\alpha$ 14.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención indicados anteriormente, dicho al menos un alérgeno es al menos un alérgeno alimentario. En ciertas realizaciones, dicho al menos un alérgeno es un alérgeno de la dieta, tal

50

como alimentos, un alérgeno ambiental, tal como el veneno de insectos que pican, o una medicación.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención indicados anteriormente, dicho al menos un alérgeno alimentario se selecciona del grupo que consiste, pero no se limita a maíz, ajo, avena, café, chocolate, encurtidos, trigo o gluten y sus productos y derivados, que incluyen trigo duro, espelta (*Triticum spelta*), kamut (*Triticum polonicum*), cuscús, salvado, salvado de trigo, germen de trigo, gluten de trigo, fécula de patata, bizcocho tostado, sémola, sémola de trigo duro, harina, harina integral de trigo, harina de trigo, almidón de trigo, almidón modificado, almidón hidrolizado, almidón comestible, almidón vegetal, goma vegetal, proteína vegetal, rellenos de cereales, ligantes de cereales, proteínas de cereales; nueces de árboles (que incluyen almendras, anacardos, nueces de macadamia, nueces de nogal y nueces del Brasil); semillas, que incluyen semillas de sésamo, girasol y amapola; antígenos derivados de productos lácteos, tales como leche y derivados de la leche, que incluyen queso y yogur; pescado o marisco o sus derivados, que incluyen del animales del filo de los moluscos (clase gasterópodos: caracoles y ostras; clase bivalvos: almeja, mejillón y ostra; clase cefalópodos: pulpo, calamar y vieira), filo de los artrópodos (familia de los crustáceos: cangrejo, langosta, camarón, gamba y cigalas) o del filo de los cordados (familia de peces cartilaginosos: raya y tiburón; peces óseos: bacalao, salmón y atún); huevos o derivados del huevo; glutamato de monosodio (MSG); sulfitos o dióxido de azufre; alergias a legumbres de la familia de las leguminosas, que incluyen cacahuete, soja (judía de soja o derivados de soja), judías secas, guisantes, judías verdes, lentejas, algarroba y regaliz; otras alergias a verduras, tales como patata; alergias a frutas de la familia de las rosáceas, que incluyen manzana, pera, cereza, melocotón y ciruela; alergias a frutas de la familia de las cucurbitáceas, que incluyen pepino, melón, sandía, calabacín y calabaza; y otras alergias a frutas, tales como las que se desarrollan frente al kiwi, plátano, aguacate, tomates, fresas y frambuesas.

También se indica que la vacuna o la composición de vacuna es una composición de vacuna para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno mediado por una expresión potenciada de IL-17, por ejemplo, una enfermedad o trastorno inflamatorio o una enfermedad autoinmunitaria, tal como la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), la colitis ulcerosa (UC) o la enfermedad de Crohn (CD). En ciertas realizaciones, la vacuna o la composición de vacuna es una composición de vacuna para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o trastorno inflamatorio o una enfermedad autoinmunitaria, tal como la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), la colitis ulcerosa (UC) o la enfermedad de Crohn (CD).

El trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17 es un trastorno mediado por una expresión potenciada de IL-17, por ejemplo, una enfermedad o trastorno inflamatorio o una enfermedad autoinmunitaria, tal como la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), la colitis ulcerosa (UC) o la enfermedad de Crohn (CD).

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención indicados anteriormente, el trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17 es una enfermedad inflamatoria, en particular una enfermedad inflamatoria que está mediada por una respuesta inmunológica de Th17 exagerada o suprarreactiva. En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención indicados anteriormente, el trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17 es una enfermedad autoinmunitaria, en particular una enfermedad autoinmunitaria que está mediada por una respuesta inmunológica de Th17 exagerada o suprarreactiva. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el trastorno es una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como la colitis ulcerosa (UC) o la enfermedad de Crohn (CD). En ciertas realizaciones, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica y alergia alimentaria.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención indicados anteriormente, el trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17 es una alergia o enfermedades y trastornos alérgicos asociados provocados por ella. En particular, en ciertas realizaciones, el trastorno es una alergia alimentaria, que incluye alergias asociadas o derivadas de los alimentos y enfermedades y trastornos alérgicos asociados provocados por ella.

En ciertas realizaciones, las enfermedades o trastornos alérgicos asociados a la alergia alimentaria incluyen, pero no se limitan a alergia a productos lácteos/leche, que incluye el síndrome de Heiner, alergia al huevo, alergia a la soja, alergia al pescado (marisco), alergia a los cacahuetes y nueces de árboles, alergia al sésamo y otras semillas, alergia al trigo y cereales, alergia a frutas y verduras, alergia a la cafeína, síndrome de alergia oral, alergia al alcohol, síndrome de alergia a los alimentos con polen, gastroenteritis eosinófila, alergia alimentaria gastrointestinal mediada por IgE y deficiencia en C1 esterasa.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el método de administración es la administración oral. En ciertas realizaciones, el método de administración es la administración sublingual o bucal. En ciertas realizaciones, el método de administración implica colocar una pastilla bajo la lengua del paciente. En ciertas realizaciones, la vía de administración es ocular o mediante la introducción en la cavidad nasal, por medio de la administración nasal. También puede introducirse mediante administración oral (deglución) de una cápsula o un dispositivo similar hacia el intestino delgado/duodeno, de modo que la cápsula no se disuelve en el estómago, sino que lo sorte y transporta/libera el subtipo de interferón alfa solo en el intestino delgado/duodeno.

**Descripción detallada de la invención**

El inventor de la presente invención ha descubierto, de modo sorprendente, que la administración de un subtipo de IFN- $\alpha$  seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos provoca la potenciación de una respuesta inmunológica mediada por células T Th1 y la represión de una respuesta inmunológica mediada por células T Th2/Th17 y, por tanto, puede desviar la respuesta inmunológica hacia una vía mediada por células (Th1), y al mismo tiempo reprimir la respuesta alérgica (Th2/Th17). De modo sorprendente, este efecto es potenciado cuando el subtipo de IFN- $\alpha$  se administra por vía oral. Este descubrimiento puede aplicarse a proporcionar un método mejorado y una composición adyuvante mejorada para tratar y/o prevenir trastornos, en los que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por células T Th1 y/o reprimir una respuesta inmunológica mediada por células T Th2/Th17, por ejemplo, trastornos inflamatorios, autoinmunitarios o de alergia. En particular, IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 o uno de sus híbridos pueden usarse como adyuvantes en vacunas para intensificar una respuesta inmunológica frente a antígenos y para dirigir la respuesta inmunológica hacia una respuesta inmunológica de Th1.

El inventor también ha descubierto que una combinación de una composición de vacuna o un alérgeno alimentario que es capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17, y un subtipo de IFN- $\alpha$  seleccionado de IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 y uno de sus híbridos, puede provocar la activación de una respuesta inmunológica mediada por células T Th1 y la represión de una respuesta inmunológica mediada por células T Th2/Th17. En particular, el inventor ha descubierto, de modo sorprendente, que la administración oral de la combinación puede provocar la activación de una respuesta inmunológica mediada por células T Th1 y la represión de una respuesta inmunológica mediada por células T Th2/Th17. Se mezcló una vacuna de la gripe convencional con una dosis baja de interferón alfa derivado de leucocitos ("leukocyte derived interferon alpha", LDA1) y se administró por vía oral a ratones. El inventor advirtió que, sin el interferón, se registró una pequeña respuesta de anticuerpos antigripe en los ratones, que fue aproximadamente 50 veces menor que con una vacuna inyectada. Con el interferón alfa, la respuesta de la vacuna administrada por vía oral era exactamente la misma que con la vacuna inyectada. Se administró una serie de inmunizaciones bucales usando un antígeno de proteína convencional y dos interferones, LDA1 y un subtipo de IFN- $\alpha$ 14 aislado, que sorprendentemente provocaron una inmunización oral en ratones a los cuales se les había administrado la composición. Sin embargo, el inventor advirtió, de modo sorprendente, que aunque el LDA1 provoca una respuesta equilibrada, el IFN- $\alpha$ 14 media solo en una respuesta humoral significativa. La producción de IgG1 es indicativa de una respuesta de Th2 (inmunidad humoral) y la producción de IgG2a es indicativa de una respuesta de Th1 (inmunidad mediada por células).

El inventor, aunque no pretenda limitación alguna por la teoría, ha identificado que la administración oral de un alérgeno alimentario capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17 y un subtipo de interferón alfa seleccionado de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 puede desviar la respuesta inmunológica hacia una vía mediada por células (Th1), y al mismo tiempo reprimir la respuesta alérgica (Th2/Th17). Por consiguiente, el inventor ha demostrado, de forma sorprendente y por primera vez, que la coadministración de un alérgeno, tal como un antígeno derivado de alimentos que provoca una alergia o enfermedades alérgicas asociadas en un sujeto, de ciertos subtipos de interferón modula la respuesta inmunológica resultante y la desvía alejándola de la respuesta de Th2/Th17, que se esperaría que se desarrollase frente al alérgeno o antígeno. Este descubrimiento sorprendente proporciona una estrategia inesperada para tratar o prevenir respuestas o enfermedades alérgicas que se producirían en sujetos como resultado de alérgenos, tales como alérgenos derivados de alimentos.

**Definiciones****Sujeto**

Tal como se define en la presente, un "sujeto" incluye mamíferos, tales como seres humanos, primates y ganado (por ejemplo, ovejas, cerdos, ganado bovino, caballos, burros); animales de ensayo de laboratorio, tales como ratones, conejos, ratas y cobayas; y animales de compañía, tales como perros y gatos.

**Tratamiento/terapia**

El término "tratamiento" se emplea en la presente para referirse a cualquier régimen que pueda beneficiar a un ser humano o a un animal no humano. El tratamiento puede ser con respecto a cualquier trastorno inflamatorio, autoinmunitario, alérgico o asociado a la alergia, y el tratamiento puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos o de alivio. La referencia en la presente a un tratamiento "terapéutico" y "profiláctico" debe considerarse en su contexto más amplio. El término "terapéutico" no implica necesariamente que un sujeto se trata hasta su recuperación total. De modo similar, "profiláctico" no significa necesariamente que el sujeto no contraiga finalmente un trastorno de enfermedad. Por consiguiente, el tratamiento terapéutico y/o profiláctico incluye la mejora de los síntomas de un trastorno alérgico concreto o la prevención o la reducción de otro modo del riesgo de desarrollar un trastorno alérgico concreto. El término "profiláctico" puede considerarse como la reducción en la gravedad o la aparición de un trastorno concreto. "Terapéutico" también puede reducir la gravedad de un trastorno existente.

**Administración**

Los ingredientes activos usados en la presente invención (por ejemplo, vacuna o alérgeno y IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 o uno

de sus híbridos) pueden administrarse por separado el mismo sujeto, opcionalmente de modo secuencial, o pueden coadministrarse simultáneamente como una composición farmacéutica, inmunogénica o de vacuna. En ciertas realizaciones, la vacuna o el alérgeno se coadministra con el subtipo de interferón alfa. La composición farmacéutica en general comprenderá un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado, seleccionado dependiendo de la vía de administración prevista.

Los ingredientes activos pueden administrarse a un paciente que necesite tratamiento a través de cualquier vía adecuada. La dosis precisa dependerá de una serie de factores, tal como se analiza a continuación con más detalle.

Una vía de administración adecuada es la vía parenteral (que incluye la vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, por medio, por ejemplo, de un parche de goteo). Otras vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a la vía oral, ocular, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), por infusión, intradérmica o administración mediante inhalación oral o nasal, por medio, por ejemplo, de un nebulizador o inhalador, o mediante un implante. Las vías de administración preferibles incluyen, pero no se limitan a la vía oral, bucal y sublingual. Las composiciones de la invención también pueden administrarse de tal forma que se dirigen, o se liberan en áreas específicas del tracto intestinal (tal como el intestino delgado/duodeno). Generalmente, dicha liberación se producirá tras el paso a través del estómago, y esta liberación dirigida puede lograrse usando revestimientos y similares.

Para la inyección intravenosa, el ingrediente activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que es apirógena y tiene un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica pueden preparar disoluciones adecuadas empleando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer lactada. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según sea necesario.

Las composiciones de la presente invención para la administración oral pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, píldoras polvo o líquido. La administración oral puede implicar colocar una pastilla bajo la lengua del paciente. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido, tal como gelatina, o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas en general comprenden un vehículo líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales o aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluir disolución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos, o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Las composiciones de la presente invención también pueden administrarse mediante microesferas, liposomas, otros sistemas de transporte en micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en ciertos tejidos, que incluyen la sangre. Los ejemplos adecuados de vehículos de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos compartidos, por ejemplo, supositorios o microcápsulas. Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que pueden usarse según la invención en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro ovalbumina, A.R., Lippincott Williams & Wilkins; 20ª edición (15 de diciembre, 2000), ISBN 0-912734-04-3; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Ansel, H.C. *et al.*, 7ª edición, ISBN 0-683305-72-7.

#### Composiciones farmacéuticas

Tal como se describió anteriormente, la presente invención se extiende a una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y alergias, tales como la alergia alimentaria y enfermedades alérgicas asociadas, y, en particular, para la inducción de una respuesta inmunológica de Th1 y la represión o la inhibición de una respuesta inmunológica de Th2/Th17.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención y para su uso según la presente invención pueden comprender, además de un ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón estabilizante u otros materiales muy conocidos por los expertos en la técnica. Estos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza concreta del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser, por ejemplo, oral, intravenosa, intranasal o mediante inhalación oral o nasal. La formulación puede ser un líquido, por ejemplo, una disolución salina fisiológica que contiene un tampón no fosfato a pH 6,8-7,6, o un polvo liofilizado.

#### Dosis

La composición se administra preferiblemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad deseada", que es suficiente para aportar un beneficio al individuo. Tal como se define en la presente, la expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria para obtener al menos parcialmente la respuesta deseada, o para retrasar la aparición o inhibir el avance o detener totalmente la aparición o el avance de un trastorno concreto que se está tratando. La cantidad varía dependiendo de la salud y la condición física del sujeto que se está tratando, del grupo taxonómico del sujeto que se está tratando, del grado de protección deseado, de la formulación de la composición, de la evaluación de la situación médica y de otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad se incluya en un intervalo relativamente amplio, que puede determinarse por medio de ensayos rutinarios. La prescripción de un tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., es, en último término, responsabilidad y está al criterio de médicos, y generalmente toma en cuenta el trastorno que se está tratando, la condición del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos

por los médicos. La dosis óptima puede ser determinada por los médicos basándose en una serie de parámetros que incluyen, por ejemplo, la edad, el sexo, el peso, la gravedad del trastorno que se está tratando, el ingrediente activo que se está administrando y la vía de administración. Puede aplicarse una amplia gama de dosis. Considerando la administración oral a un paciente humano, puede administrarse, por ejemplo, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1000 µg del agente por dosis humana, opcionalmente para 3 a 4 dosis. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima y reducir los efectos secundarios. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas a diario, cada semana, cada mes o a otros intervalos de tiempo adecuados, o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el significado que entienden habitualmente los expertos en el campo de la técnica a la cual pertenece la presente invención.

#### Enfermedad autoinmunitaria

La expresión "enfermedad autoinmunitaria", tal como se emplea en la presente, significa cualquier enfermedad o trastorno que es provocado porque los tejidos del cuerpo están siendo atacados por su propio sistema inmunológico.

A lo largo de la memoria descriptiva, a menos que el contexto demande lo contrario, los términos "comprende" o "incluye", o variaciones tales como "que comprende" o "comprendiendo", "que incluye" o "incluyendo" implican que incluyen un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

La presente invención se ejemplificará a continuación remitiéndose a los siguientes ejemplos y figuras no limitantes, que se proporcionan como ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Otras realizaciones de esta invención serán evidentes para los expertos en la técnica a la vista de esta descripción.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una gráfica de la producción de subtipos de IgG (IgG1 e IgG2a) en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y diferentes subtipos de IFN-α.

La figura 2 muestra una gráfica del porcentaje del subtipo de IgG (IgG1 e IgG2a) producido en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y diferentes subtipos de IFN-α.

La figura 3a muestra una gráfica de la producción de IgG2a en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y MULTIFERON™, IFN-α14 glicosilado y IFN-α14 no glicosilado administrados mediante inyección intraperitoneal.

La figura 3b muestra una gráfica de la producción de IgG1 en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y MULTIFERON™, IFN-α14 glicosilado y IFN-α14 no glicosilado administrados mediante inyección intraperitoneal.

La figura 3c muestra una gráfica de la producción de IgG2a en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y MULTIFERON™, IFN-α14 glicosilado y IFN-α14 no glicosilado administrados por vía oral.

La figura 3d muestra una gráfica de la producción de IgG1 en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y MULTIFERON™, IFN-α14 glicosilado y IFN-α14 no glicosilado administrados por vía oral.

La figura 4 muestra la inhibición de la secreción de interleuquina-17 (IL-17) por PBMC con lipopolisacárido (LPS) solo y con LPS y concentraciones crecientes de IFN-α2a (negro), IFN-α10 (blanco) o IFN-14 (gris).

La figura 5 muestra la inhibición del desarrollo de células Th2 CD4+ inducida por interleuquina-4 (IL-4) usando concentraciones crecientes de IFN-α2a (negro), IFN-α10 (blanco) o IFN-14 (gris).

Ejemplo 1: Identificación de subtipos de interferón alfa que son adyuvantes inmunológicos

Se administraron 50 µg de ovoalbúmina y 10<sup>5</sup> IU de los subtipos de interferón IFN-α14, IFN-α2, IFN-α21, IFN-α10, una "mezcla" de IFN (que incluye IFN-α1, IFN-α8, IFN-α21 y quizás IFN-α17), IFN-α8, Intron A, MULTIFERON™ e IFN-α1 en 50 µl mediante una inyección intraperitoneal tres veces semanales a ratones BALB-c hembra, en grupos de 10.

Se midieron las concentraciones en suero de IgG1 mg/ml (respuesta de Th2 - inmunidad humoral frente al antígeno de ovoalbúmina) e IgG2a mg/ml (respuesta de Th1 - inmunidad mediada por células frente al antígeno de ovoalbúmina) mediante ELISA.

Las figuras 1 y 2 muestran la producción del subtipo de IgG antiovoalbúmina en ratones BALB-c tratados con IFN-α14, IFN-α2, IFN-α21, IFN-α10, una "mezcla" de IFN-α1, IFN-α8, IFN-α21 y quizás IFN-α17, IFN-α8, Intron A, MULTIFERON™, solo ovoalbúmina, ovoalbúmina más albúmina de suero humana (usada como vehículo en las preparaciones de interferón) e IFN-α1.

El inventor demostró que IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 potencian significativamente la producción de anticuerpos de IgG2a, lo cual es indicativo de una respuesta inmunológica de Th1 potenciada. El inventor también demostró que IFN- $\alpha$ 10, en particular, muestra una baja producción de anticuerpo IgG1, lo cual es indicativo de la represión de una respuesta inmunológica de Th2 /Th17.

- 5 Ejemplo 2: Identificación de una respuesta de anticuerpos en ratones BALB-c después de la administración de una composición que comprende una vacuna de la gripe y una dosis baja de interferón alfa derivado de leucocitos (LDA1)

La vacuna de la gripe convencional se mezcló con una dosis baja ( $10^5$  IU) de interferón alfa derivado de leucocitos (LDA1). Sin el interferón, se registró una pequeña respuesta de anticuerpos antigripe en los ratones, que fue aproximadamente 50 veces menor que con una inyección. Con el interferón alfa, la respuesta de la vacuna administrada por vía oral era exactamente la misma que con la vacuna inyectada. Se realizaron una serie de inmunizaciones bucales usando un antígeno de proteína convencional (ovoalbúmina). Se compararon dos interferones, concretamente, el LDA1 y un subtipo aislado, IFN- $\alpha$ 14. Ambos produjeron una notable inmunización oral de los ratones, pero mientras que el LDA1 produjo una respuesta equilibrada, el IFN- $\alpha$ 14 solo produjo una respuesta humoral significativa. La producción de IgG1 es indicativa de una respuesta de Th2/Th17 (inmunidad humoral) y la producción de IgG2a es indicativa de una respuesta de Th1 (inmunidad mediada por células).

Ejemplo 3: Identificación de IFN- $\alpha$  como un adyuvante inmunológico oral

Se administraron 50  $\mu$ g de ovoalbúmina y  $10^5$  IU de subtipos de interferón, concretamente MULTIFERON™, IFN- $\alpha$ 14 glicosilado y IFN- $\alpha$ 14 no glicosilado, en dosis de 50  $\mu$ l tres veces semanales a ratones BALB-c hembra mediante administración por vía oral (bucal) y con una inyección intraperitoneal.

Los controles usados fueron solo antígeno y Titermax. Titermax es una mezcla de compuestos usados en la generación de anticuerpos y la vacunación para estimular al sistema inmunológico para que reconozca un antígeno administrado junto con la mezcla. Titermax es un adyuvante inmunológico recientemente desarrollado que se considera seguro en animales.

- 25 Se cuantificaron las concentraciones en suero (mg/ml) de anticuerpos IgG1 (indicativo de una respuesta de Th2/Th17) e IgG2a (indicativo de una respuesta de Th1) antiovoalbúmina mediante ELISA.

Se comparó la producción de los anticuerpos IgG2a e IgG1 cuando se administra MULTIFERON™, IFN- $\alpha$ 14 glicosilado y IFN- $\alpha$ 14 aglicosilado (derivado de células CHO) por vía oral y mediante inyección (véanse las figuras 3a, 3b, 3c y 3d).

- 30 El inventor demostró que IFN- $\alpha$ 14 muestra una pronunciada actividad de adyuvante inmunológico por vía oral y mediante inyección. No se observó una diferencia significativa entre las preparaciones glicosiladas y no glicosiladas.

El inventor también demostró que IFN- $\alpha$ 14 solo potencia la producción de IgG2a asociada a las respuestas de Th1 mediante la vía de administración oral. Por tanto, IFN- $\alpha$ 14 es un activador de la inmunidad mediada por células cuando se administra por vía oral.

- 35 MULTIFERON™ potencia ambas respuestas de IgG1 e IgG2a cuando se administra por vía oral y mediante inyección, es decir, induce ambas respuestas de Th1 y Th2 significativamente.

Ejemplo 4: Generación de un modelo animal *in vivo* de alergia alimentaria

Se obtuvieron la enterotoxina B estafilocócica (SEB) y la ovoalbúmina (OVA; de calidad V) en Sigma-Aldrich, y se preparó el extracto de cacahuets enteros ("whole peanut extract", WPE) a partir de cacahuets crudos sin sal usando tampón Tris 20 mmol/l, tal como ha sido previamente descrito (Koppelman S.J., *et al.*). La concentración de proteínas totales del WPE puede determinarse mediante el ensayo de proteínas de ácido bicinonínico de Pierce (BCA).

45 Cuatro ratones BALB/c hembra o ratones C57B1/6 hembra de 8 semanas de edad se alojan bajo condiciones sin patógenos específicas y se mantienen con una dieta sin cacahuets y OVA. A los ratones se les administran 100 mg de OVA y diversas concentraciones de SEB en un volumen final de 100  $\mu$ l usando una aguja de alimentación de ratones con extremo en forma de bola una vez semanal durante 8 semanas. La sensibilización a la WPE se realiza utilizando 100  $\mu$ g de WPE combinados con 10 mg de SEB.

En la semana 9, los ratones reciben una exposición en embolada del antígeno oral (5 mg). Se realiza la puntuación de los síntomas de una manera ciega por dos investigadores independientes según parámetros de síntomas previamente descritos para determinar las respuestas mediadas por IgE en la alergia alimentaria murina (Li X.M. *et al.*). Brevemente, se asigna 0 si no hay síntomas evidentes, y se asigna de 1 a 5 si se observan síntomas, en los que:

- 1 representa rascado suave, frotamiento o ambos de la nariz, cabeza o patas;

## ES 2 734 550 T3

- 2 y 3 representan síntomas intermedios (por ejemplo, edema alrededor de los ojos o boca, pelo de punta y/o dificultad de respirar);
  - 4 representa una motilidad significativamente reducida, temblores y/o insuficiencia respiratoria significativa; y
  - 5 representa la muerte.
- 5 Una hora después, los ratones se sangran para determinar los niveles de histamina en plasma. Veinticuatro horas después, los ratones pueden sacrificarse y los tejidos se recogen para el análisis. Se determina la presión sanguínea en grupos de tres ratones BALB/c sensibilizados con SEB/OVA que se colocan en un sistema de presión sanguínea no invasivo Coda 1 (Kent Scientific, EE. UU.) durante 5 minutos para establecer los parámetros de la línea de base. Los ratones después se exponen a 5 mg de OVA o PBS, y los parámetros se miden cada 30 segundos.
- 10 Ensayos
- Niveles de inmunoglobulina en suero
- El suero se recoge y se determinan los niveles de anticuerpos específicos mediante un ELISA de "sandwich". Se cuantifican los niveles de IgG1, IgG2a, e IgE específicas de OVA. Se determinan los niveles de IgE específica de SEB usando SEB marcado con biotina como reactivo secundario para detectar la IgE capturada con anti-IgE. Se
- 15 determinan los niveles de IgE específica de WPE revistiendo placas de ELISA con WPE 1 mg/ml y detectando las inmunoglobulinas específicas de antígeno unidas con anticuerpos específicos de isotipo disponibles en BD Pharmingen.
- Cuantificación de eosinófilos en sangre
- Se recoge sangre hacia tubos revestidos con EDTA y se determinan los números de eosinófilos absolutos después
- 20 de una tinción con fluido de Discombe.
- Producción de citoquinas
- Se preparan suspensiones de una sola célula de esplenocitos y se cultivan durante 48 horas a una concentración de 2-3  $10^6$  ml en presencia o ausencia de OVA (100 mg/ml) o WPE (1 mg/ml). Además, pueden prepararse otros cultivos en placas revestida con anti-CD3e de ratón (BD Pharmingen) (1 mg/ml). Se determinan las concentraciones
- 25 de citoquinas en los sobrenadantes del cultivo usando ensayos de matrices de esferas citométricas de Th1/Th2 ("Cytometric Bead Array", CBA) disponibles en BD Pharmingen. El límite de detección es menor que 2 pg/ml para cada citoquina.
- Histología
- Se recolecta el tejido, se fija en formol y después se introduce en parafina y se tiñe con hematoxilina y eosina o
- 30 eritrosinato de pinacianol para las células cebadas en Histo-Scientific Research Laboratories. Puede determinarse el número de células cebadas y el estado de activación contando las células con gránulos metacromáticos densos y forma compacta, comparadas con las que presentan gránulos dispersos que se extienden claramente hacia fuera del cuerpo celular. Se determina el número promedio de células cebadas a partir de 20 campos de alta potencia (aumento 3400X) para cada muestra.
- 35 Niveles de histamina en plasma
- Se determinan los niveles de histamina en plasma usando un kit de EIA disponible en Becton Dickenson, según las instrucciones del fabricante.
- Observaciones
- Se espera que SEB administrada con el antígeno provoque respuestas inmunológicas frente al antígeno. Se espera
- 40 que las respuestas estén muy polarizadas hacia Th2, y se espera que una exposición oral al antígeno active la anafilaxis y la desgranulación de células cebadas local y sistémica. Se espera que la sensibilización dirigida por SEB induzca un eosinofilia en la sangre y los tejidos intestinales.
- Ejemplo 5: Determinación *in vitro* de la inhibición de la inmunidad humoral (Th2/Th17) por subtipos de interferón alfa - análisis de linfocitos Th17 e interleuquina 17
- 45 Un total de 2 x  $10^6$  PBMC humanas se estimularon con lipopolisacárido (LPS) en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de alfa-IFN humano recombinante. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas y se midieron las concentraciones de IL-17 mediante ELISA.
- Cultivo de células humanas
- Se recolecto sangre periférica humana de voluntarios sanos y se obtuvieron las células mononucleares de sangre
- 50 periférica ("peripheral blood mononuclear cells", PBMC) mediante una centrifugación en gradiente de Lymphoprep

(Pierce). Para los experimentos con PBMC, se sembraron  $2 \times 10^6$  PBMC por ml en placas de 24 pocillos y se estimularon con lipopolisacárido (LPS) procedente de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma) o se sembraron  $2 \times 10^6$  PBMC por ml en placas de 24 pocillos y se estimularon con 5 mg/ml de anti-CD3 unido a una placa (clon: UCHT1) y 2,5 mg/ml de anti-CD28 (clon: CD28.2). Se obtienen células T sin estimular (CD4+CD45RA) mediante marcaje magnético y depuración de las células T no adyuvantes y las células T de memoria realizados según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Un total de  $1 \times 10^5$  células T sin estimular se cebaron en placas de fondo plano de 96 pocillos revestidas con anticuerpos anti-CD3 (clon UCHT1, 2,5 mg/ml) y con anti-CD28 (clon CD28.2, 2,5 mg/ml). Después de 48 h de cultivo se añade 20 IU/ml de IL-2 humana recombinantes (Peprotech) al cultivo.

Para la diferenciación de Th17 humanas, las células se suplementan con anticuerpos neutralizantes anti-IL-4 y anti-IFN $\gamma$  (ambos de Peprotech) y con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  recombinante y 50 ng/ml de IL-6 recombinante (ambos de Peprotech). Cuando fue necesario se añadió IFN $\alpha$ 10/14 humana recombinante al cultivo. Después de 5 días de cultivo, las células se lavan, se trasladan a nuevas placas y se expanden hasta el día 12 en presencia de 20 IU/ml de IL-2 recombinante.

#### ELISA y tinción de citoquinas intracelulares

Se evaluó la capacidad de producción de IL-17 de células Th17 cebadas mediante estimulación con 0,1 ng/ml de LPS o, como alternativa, mediante la estimulación de células humanas con 1 mg/ml de anti-CD3 soluble (clon: 0KT3) y forbol-12-13-dibutirato (PdBu). Se determinaron las concentraciones de IL-17 humana en los sobrenadantes del cultivo celular usando parejas de anticuerpos y patrones de proteínas disponibles en el mercado (R&D Systems). Se determinó la absorción usando un lector de ELISA a 450 nm. Para la tinción intracelular de IFN $\gamma$  e IL-17 de ratón, las células T se estimularon con PMA e ionomicina durante 5 horas. Se añade brefeldina A durante las 3 h finales del cultivo. La tinción intracelular puede realizarse con un kit BD Cytotfix/Cytoperm según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con anti-IFN $\gamma$  marcado con isotiocianato de fluoresceína (clon: XMG1.2, BD Pharmingen) y anti-IL-17A de ratón marcado con Alexa Fluor 647 (clon: eBio17B7, eBioscience). Después del lavado, las células se analizan inmediatamente usando la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

#### Resultados

IFN $\alpha$ 10 > IFN $\alpha$ 14 > IFN $\alpha$ 2a.  $P < 0,05$  (figura 4).

Ejemplo 6: Determinación *in vitro* de la inhibición de la inmunidad humoral (Th2/Th17) por subtipos de interferón alfa - análisis de células Th2 y citoquinas asociadas

#### Entorno de CRTH2

CRTH2 ("Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells", molécula homóloga al receptor quimioatrayente expresada sobre células Th2) es un receptor acoplado a proteína G expresado por linfocitos Th2, eosinófilos y basófilos. El receptor media en la activación y la quimiotaxis de estos tipos de células en respuesta a la prostaglandina D2 (PGD2), el principal prostanoides producido por las células cebadas. La PGD2 se libera a través de la desgranulación de células cebadas en la fase inicial de las reacciones mediadas por IgE. También se cree que este proceso aparece en el sitio de la inflamación, tal como la mucosa nasal y bronquial. A través de la interacción con CRTH2, se cree que PGD2 media en el reclutamiento y la activación de tipos de células que portan CRTH2 hacia el sitio de la reacción alérgica, amplificando y manteniendo en consecuencia la inflamación alérgica. En la mucosa nasal y bronquial, se cree que esta cascada proinflamatoria se inicia durante la denominada respuesta alérgica tardía que aparece de 3 a 9 horas después de la exposición al alérgeno. Por tanto, la interacción entre PGD2 y CRTH2 contribuiría a la denominada "polarización de Th2", con la consecuente producción de citoquinas de Th2 y las características típicas eosinófilas y basófilas de la inflamación.

El IFN $\alpha$  inhibe el desarrollo de Th2 CD4+ humanas

Se activaron células CD4+/CD45RA+ humanas purificadas con anti-CD3/anti-CD28 unidos a placas bajo condiciones de citoquinas definidas. Se evaluó la inducción de la expresión de CRTH2 mediante citometría de flujo. Todos  $P < 0,05$ , por encima de IFN 100 IU comparado con IL-4 sola.

#### Sujetos humanos

Se recogió sangre periférica de donantes adultos sanos y las células se purificaron como se indica a continuación.

#### Cultivos de células T y análisis

Se obtuvo sangre periférica de hombres donantes adultos sanos y las células T CD4+/CD45RA+ sin estimular se purificaron (>92%) a partir de la capa leucocítica mediante separación con esferas magnéticas (BD Biosciences, EE. UU.). Las células CD4+ se activaron con anti-CD3/anti-CD28 e IL-2 unidos a placas (50 U/ml) en medio de Dulbecco modificado de Iscove completo que contenía FCS al 10%, en presencia de IL-4 recombinante humana (R&D Systems, EE. UU.), a una concentración de 20 ng/ml durante 7 días. Se realizaron análisis citométricos de flujo con hCD294 (molécula homóloga de receptor quimioatrayente expresada sobre células Th2 [CRTH2])-Alexa 647 (BD

Biosciences).

#### Resultados

5 En seres humanos, el receptor de PGD2, CRTH2, se expresa selectivamente sobre células Th2 y es inducido por IL-4 durante el desarrollo de las Th2. La IL-4 estimula el desarrollo de células que expresan CRTH2. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 5, todos los IFN alfa bloquearon notablemente la expresión de CRTH2 dirigida por IL-4 de una manera dependiente de la dosis, en el orden  $IFN\alpha10 > IFN\alpha14 > IFN\alpha2a$ , lo cual apoya la idea de que estas citoquinas reprimen la inmunidad de Th2 (humoral), pero se reconocen como potentes activadores de la inmunidad asociada a Th1.

**REIVINDICACIONES**

1.- Una composición que comprende:

(i) una vacuna; y

5 (ii) el interferón alfa de subtipo IFN- $\alpha$ 14 para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17; en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria y una alergia o un trastorno alérgico asociado; y en la que la vacuna se proporciona de modo secuencial, por separado o simultáneamente con el IFN- $\alpha$ 14.

10 2.- La composición para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, según se reivindica en la reivindicación 1, en la que el trastorno es una alergia o un trastorno alérgico asociado.

15 3.- La composición para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, según se reivindica en la reivindicación 2, en la que la vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar en una respuesta inmunológica de Th2/Th17 contra él.

4.- La composición para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, según se reivindica en la reivindicación 3, en la que dicho al menos un alérgeno es un alérgeno alimentario.

20 5.- La composición para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición se proporciona para la administración oral.

25 6.- La composición para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el subtipo de interferón alfa es una forma recombinante de IFN- $\alpha$ 14.

7.- La composición para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, según se reivindica en la reivindicación 1, en la que el trastorno es una enfermedad inflamatoria del intestino.

30 8.- La composición para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, según se reivindica en la reivindicación 7, en la que la enfermedad inflamatoria del intestino es la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn.

9.- La composición para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que se desea potenciar una respuesta inmunológica mediada por Th1 y reprimir una respuesta inmunológica mediada por Th2/Th17, según se reivindica en la reivindicación 1, en la que el tratamiento es un tratamiento profiláctico.

35

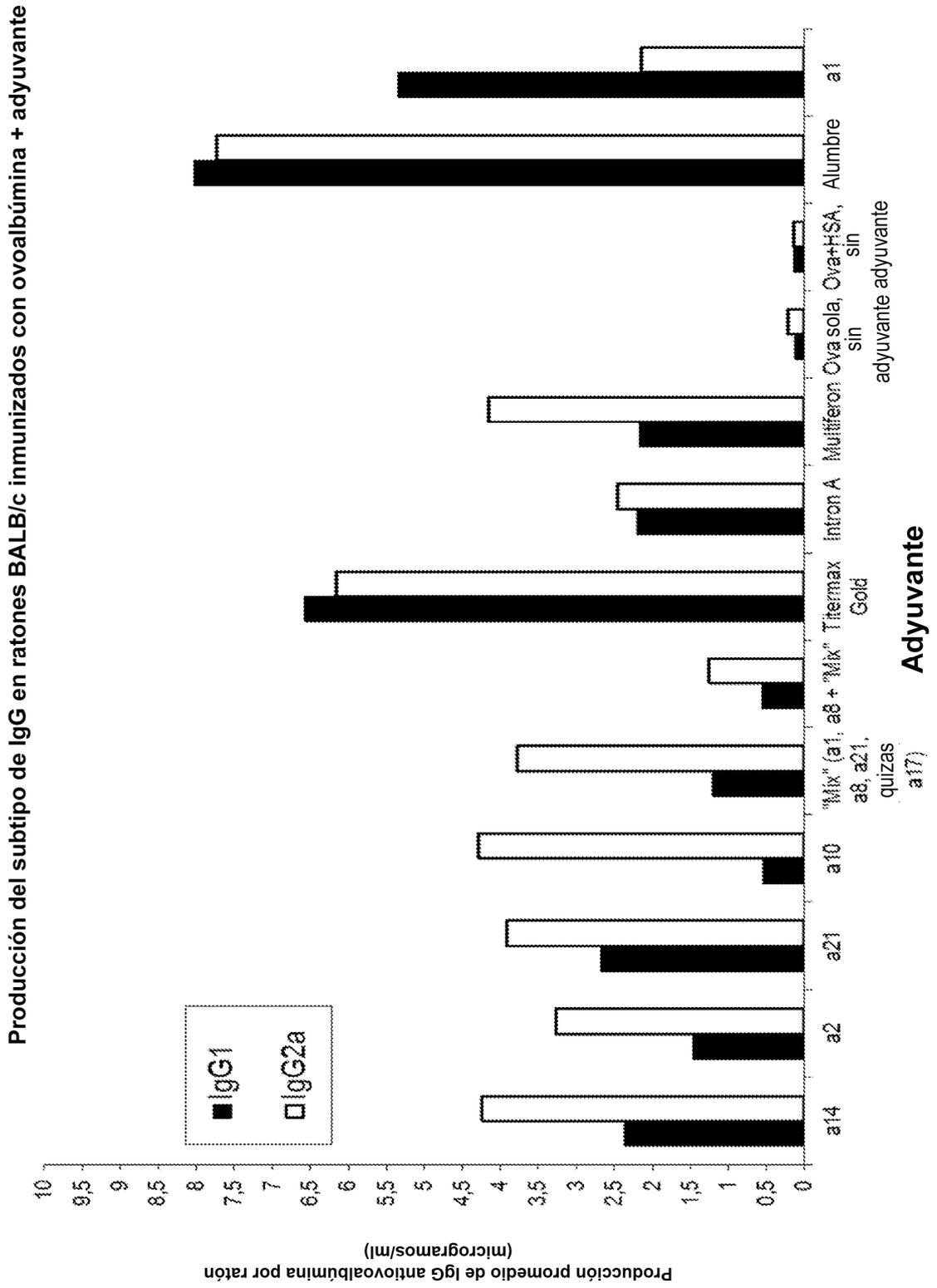


Figura 1

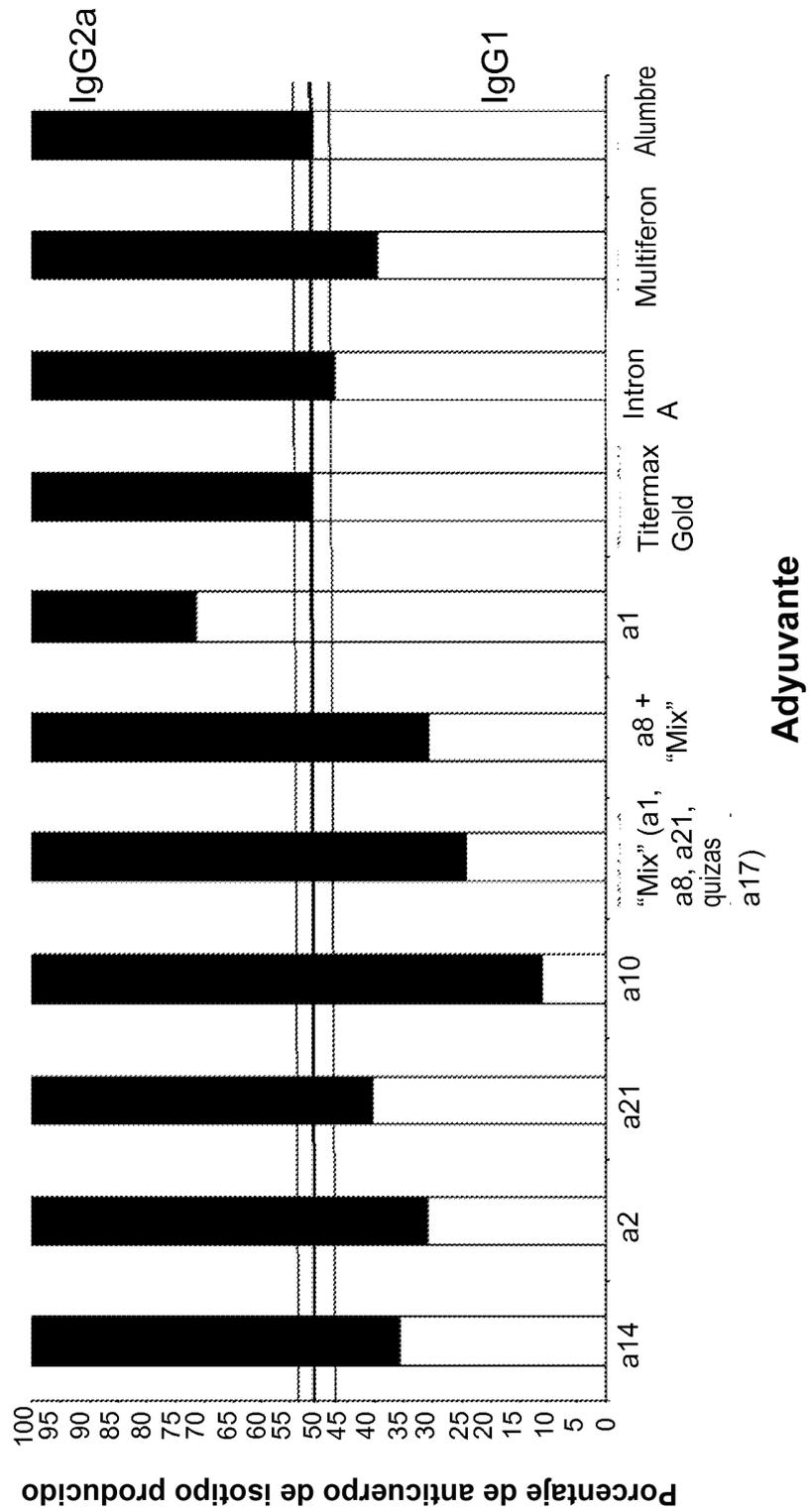


Figura 2

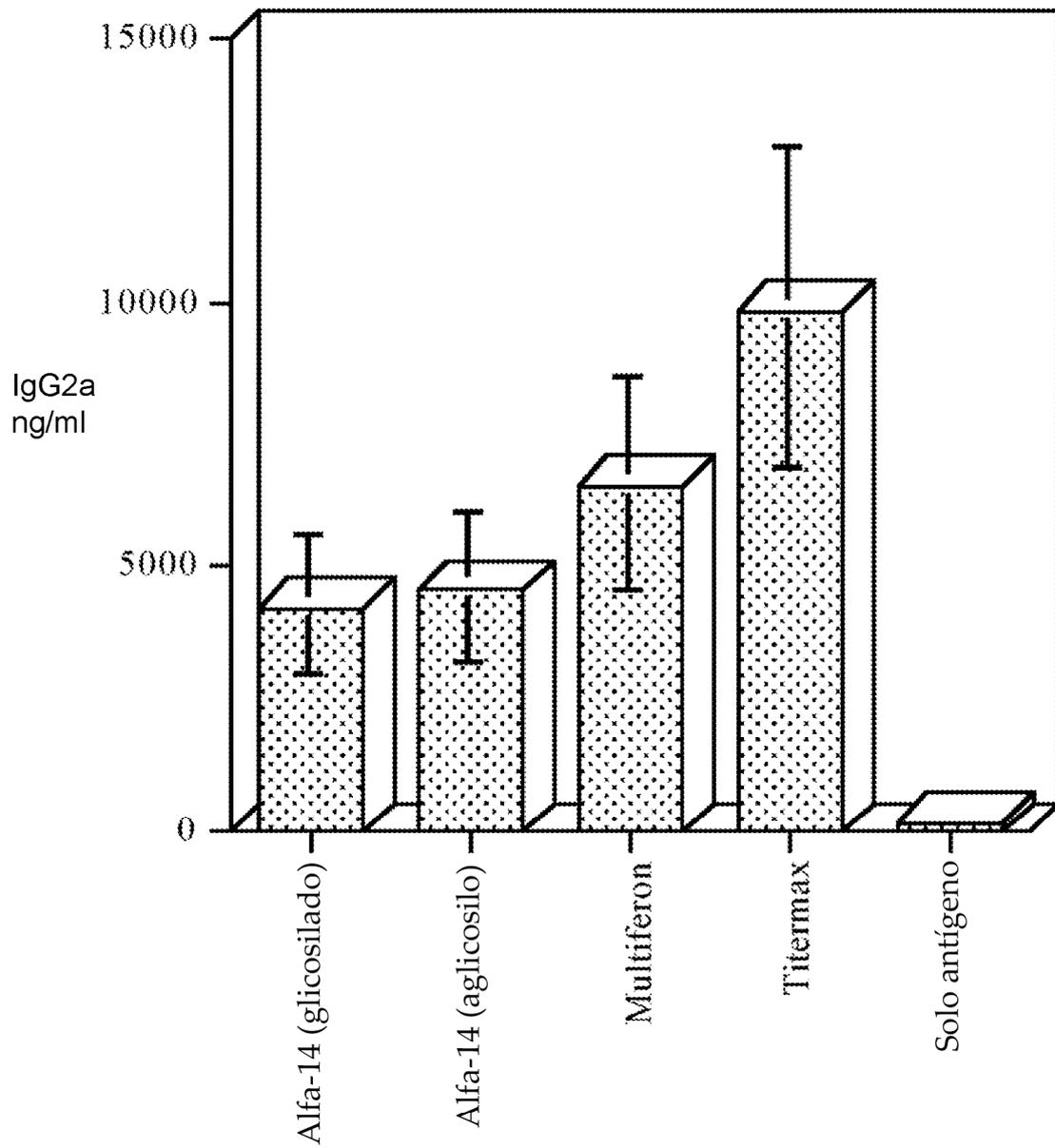


Figura 3a

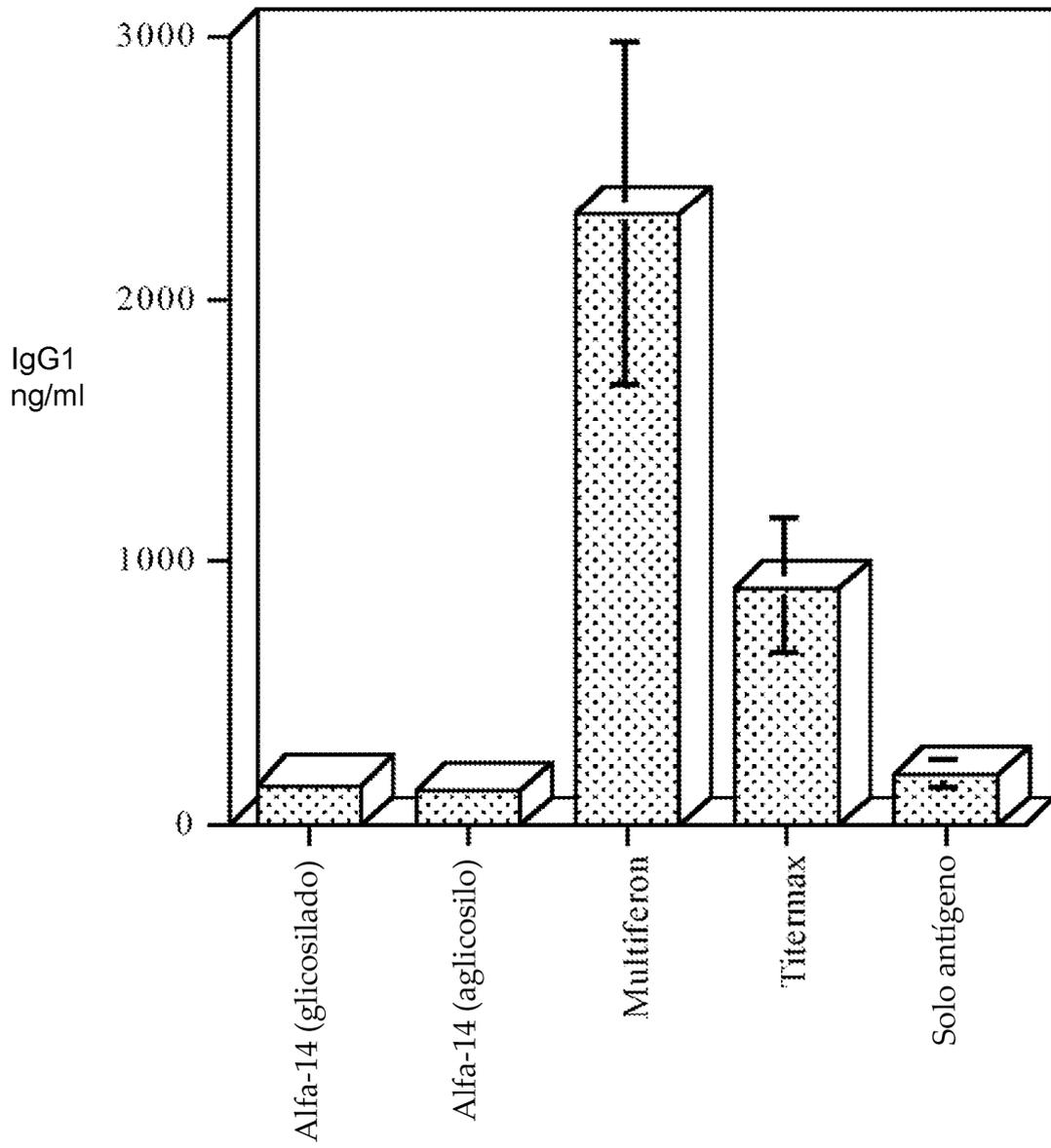


Figura 3b

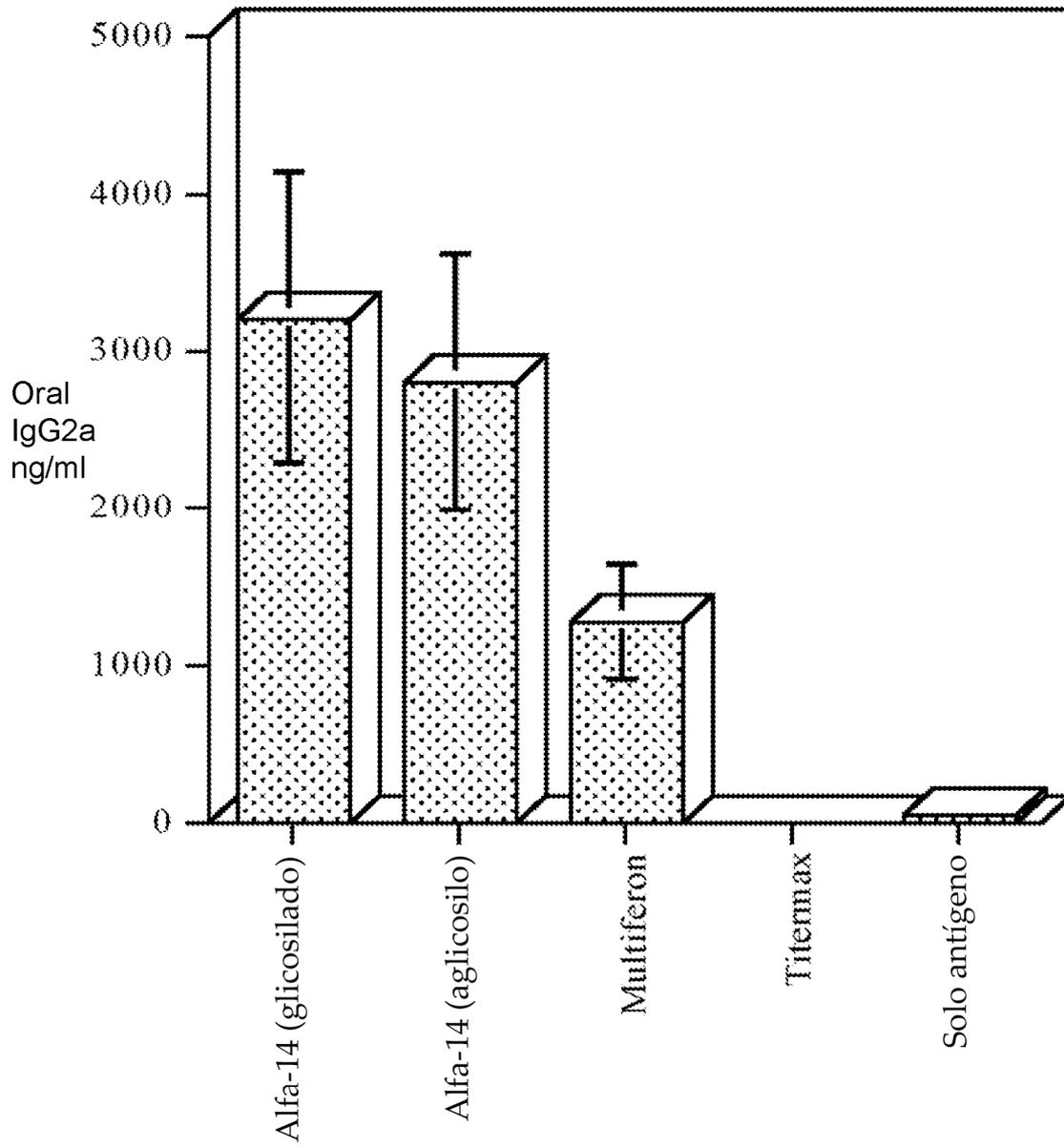


Figura 3c

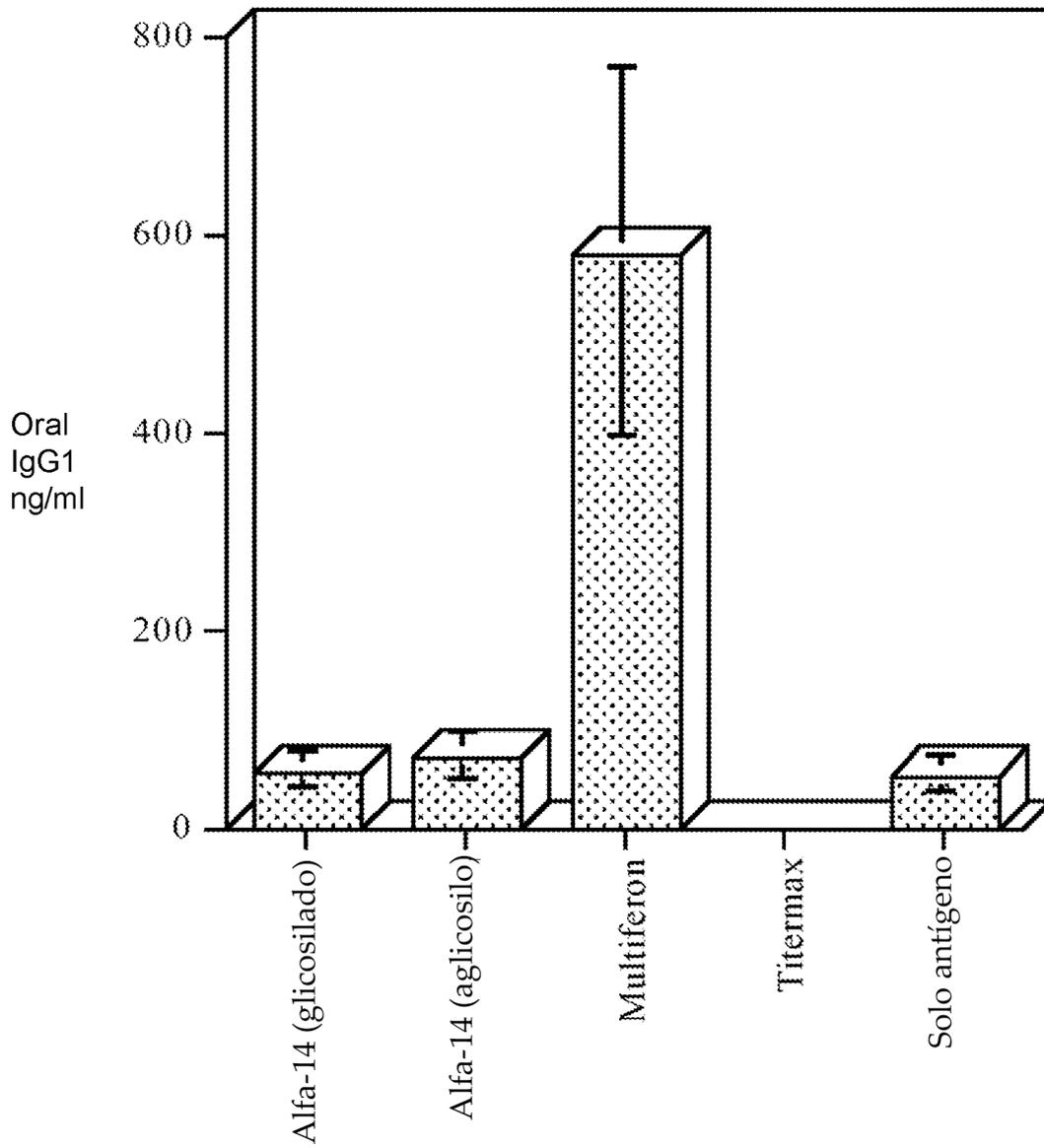


Figura 3d

**Inhibición de la secreción de interleuquina-17  
por PBMC humanas**

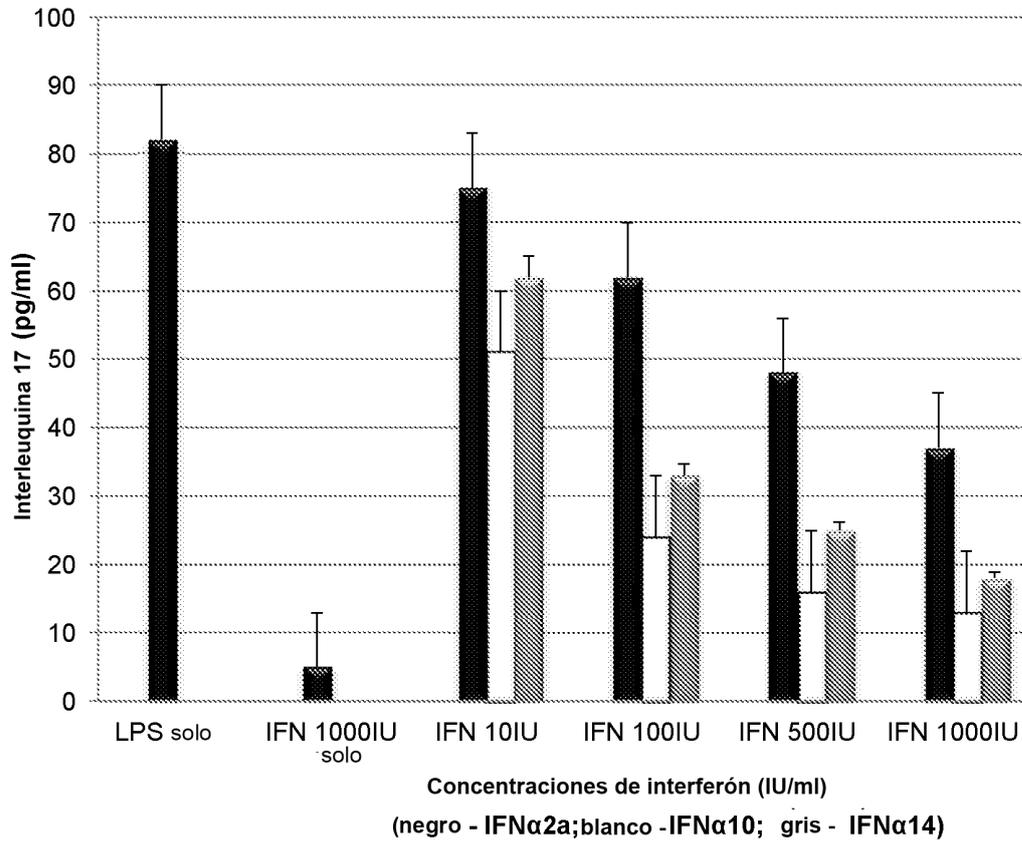


Figura 4

**Inhibición del desarrollo de células Th2 CD4+**

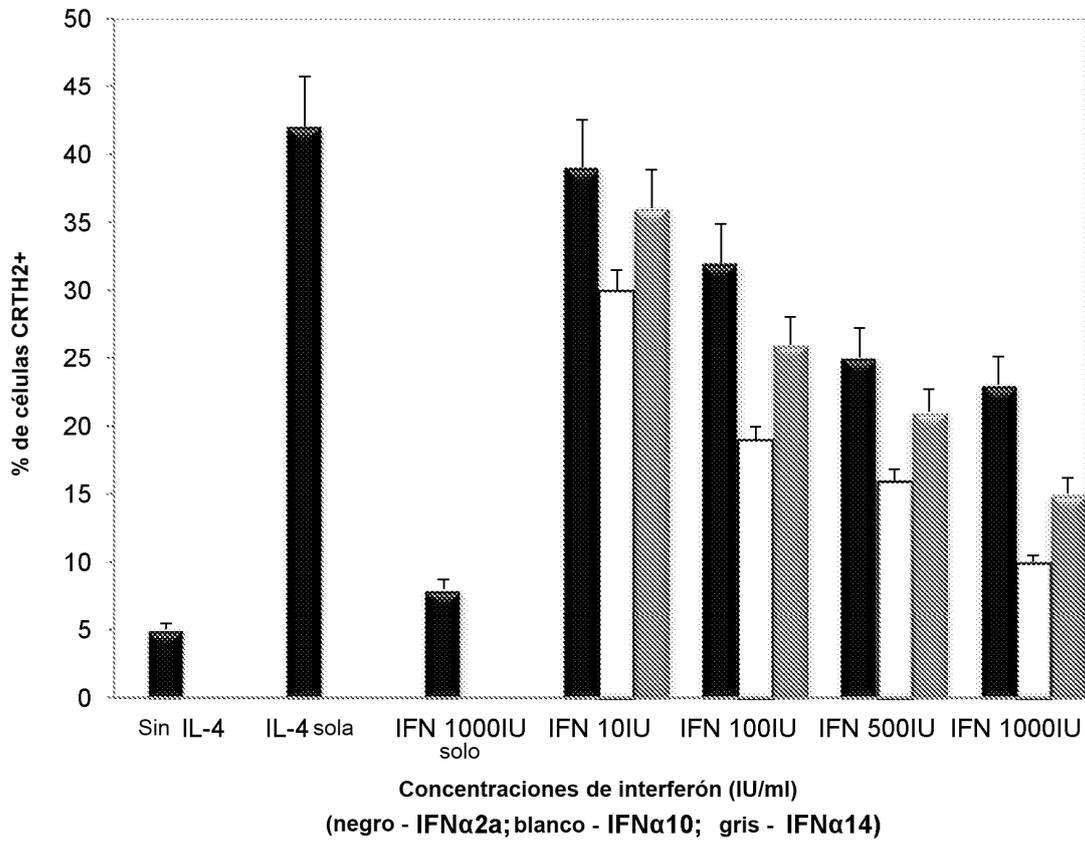


Figura 5