

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 378**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/35** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2013 E 17180424 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3248616**

54 Título: **Método para prevenir alergias**

30 Prioridad:

**06.02.2012 US 201261595577 P**  
**13.02.2012 EP 12305153**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.12.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

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

**ES 2 798 378 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para prevenir alergias

**Campo de la invención**

5 Se describen composiciones y métodos para prevenir la alergia en un sujeto. En particular, la presente invención se refiere a la prevención epicutánea de alergias en niños. La invención se refiere también composiciones para uso en tales métodos, así como a su fabricación. La invención se puede usar para originar la protección contra alergias alimentarias o respiratorias.

**Antecedentes de la invención**

10 La alergia ocupa un lugar cada vez más importante en la práctica médica diaria. Es un fenómeno mundial de salud pública clasificado como la cuarta lacra mundial por la OMS. En Francia, uno de cada tres franceses es alérgico y tanto la alergia respiratoria como la alimenticia afectan a una porción creciente de la población de adultos y niños.

15 La desensibilización (o inmunoterapia) es la técnica según la cual, mediante la administración de cantidades mínimas de alérgenos, es posible suprimir más o menos la reacción alérgica a estos alérgenos. Mediante la administración progresiva del alérgeno, en dosis constantes o variables, el sujeto se hace más tolerante al alérgeno. La inmunoterapia ha demostrado ser eficaz en pacientes afectados con alergia grave dependiente de IgE, sensibilizada a un número restringido de alérgenos. La desensibilización puede reducir los síntomas relacionados con la reacción alérgica a corto plazo, así como la progresión de la sintomatología hacia signos clínicos más graves, tales como, por ejemplo, la transformación de la rinitis alérgica en asma (Tij et al., 2004). Desde el comienzo del año 2000, ha sido reconocido por la OMS como el único método para tratar básicamente la alergia.

20 Aunque los mecanismos de acción de la inmunoterapia todavía no son bien conocidos, parecen implicar (i) un aumento de las IgG y, en particular, de las fracciones de IgG4, bloqueando estos anticuerpos in vitro los efectos biológicos de las IgE; (ii) una modificación de la respuesta inmunológica de TH1 y TH2, promoviendo una respuesta TH1/TH2 más equilibrada; y/o (iii) una producción de células T que producen interleucina 10 (IL-10), que exhiben propiedades antialérgicas contra mastocitos, ciertos linfocitos T y eosinófilos y también promueven la producción de IgG4.

25 La inmunoterapia puede realizarse mediante varios protocolos o rutas, incluyendo subcutánea, sublingual, nasal o epicutánea. La inmunoterapia subcutánea es ampliamente utilizada. Aunque es costosa y requiere la intervención de un médico especialista en cada inyección, todavía hoy se considera como la vía estándar de desensibilización en niños (Pajno et al., 2005). Sin embargo, no se produce sin riesgos, ya que la frecuencia de muertes se estima en 1 por 2,5 millones de inyecciones con un promedio de 3,4 muertes al año. Además, no se usan alérgenos potencialmente anafilácticos con alto riesgo de reacción, tales como los frutos secos y la mayoría de los alérgenos alimentarios, para el tratamiento de desensibilización subcutánea.

30 La inmunoterapia sublingual es considerada por la OMS como una alternativa satisfactoria a la inmunoterapia subcutánea. Mucho mejor tolerada por los pacientes, la inmunoterapia sublingual es considerada, por muchos autores, que proporciona una mejor relación costo-efectividad que las otras vías de administración, ya que no requiere la intervención de un médico y puede ser autoadministrada por los pacientes (Pajno et al., 2005). Además, las reacciones adversas son raras durante los tratamientos a través de una vía sublingual, estimada en de 0,1 a 0,2 reacciones por 1.000 dosis administradas. Tales reacciones son principalmente menores, afectando a la cavidad bucal o al área sublingual o a la esfera gastrointestinal (La Rosa et al, 1999).

35 En términos de efectividad, sin embargo, la vía sublingual se considera menos eficaz que la vía subcutánea: requiere el uso de una mayor cantidad de alérgenos y no se puede autorizar con todos los alérgenos. Esto es así a pesar de que las pruebas a través de esta ruta para la desensibilización a los cacahuetes y a la leche de vaca están en curso. La seguridad del uso de esta técnica con otros alérgenos alimentarios aún no se ha evaluado.

40 La inmunoterapia intra-nasal ha demostrado ser eficaz en 17 estudios controlados de cada 18. Por lo tanto, es una vía eficaz y segura para tratar, al menos, la rinitis alérgica. Sin embargo, generalmente es poco tolerada por los pacientes, lo que limita cada vez más su uso clínico. En un estudio que comparaba diferentes rutas de desensibilización, los tratamientos vía nasal se interrumpieron prematuramente en aproximadamente el 50% de los casos antes de un año, mientras que el cese temprano ocurrió en menos del 10% de los niños tratados por vía subcutánea o sublingual (Pajno et al, 2005).

45 La inmunoterapia epicutánea se basa en la aplicación a la piel. Este método comprende típicamente la aplicación repetida de un alérgeno conocido por provocar una alergia existente en la piel de un sujeto, llevando generalmente a la difusión del alérgeno en las capas superficiales de la piel. Los experimentos llevados a cabo por los inventores han demostrado que el tipo de respuesta inmunitaria generada por la inmunoterapia epicutánea puede ser controlada por las condiciones de tratamiento. Por ejemplo, la solicitud internacional asignada comúnmente  
50 WO2009/080934 describe que se puede obtener una potente desensibilización a un alérgeno mediante terapia epicutánea usando un alérgeno, sin adyuvante, aplicado sobre un área intacta de la piel. De manera similar, la

solicitud internacional comúnmente asignada WO2009/071599 describe que se puede obtener una fuerte desensibilización al cacahuete por inmunoterapia epicutánea.

5 Dioseghy et al. (The Journal of Immunology, 2011, 186:5629-5637) describen un estudio exploratorio realizado en ratones BALB/c sensibilizados a la ovoalbúmina (OVA). Este estudio pretendía analizar las diferentes etapas del proceso inmunológico de un alérgeno depositado en la piel por un sistema de administración epicutáneo (EDS, por "epicutaneous delivery system"), concretamente un parche Viaskin®. Dioseghy et al. muestran que la OVA aplicada sobre la piel mediante el EDS no conducía a un avance pasivo y a una liberación sistémica. Por el contrario, el alérgeno era capturado por las células dendríticas de la piel y migraba a los nodos linfáticos eferentes para activar respuestas inmunes y citoquinas específicas de OVA.

10 En los experimentos y publicaciones anteriores, los efectos específicos de alérgeno de inmunoterapia epicutánea fueron investigados por los inventores. Continuando con esta investigación, los inventores han encontrado ahora sorprendentemente que, dependiendo de las condiciones de tratamiento, se puede emplear inmunoterapia epicutánea como tratamiento profiláctico para prevenir el desarrollo de alergias en pacientes alérgicos. Este resultado inesperado permite, por lo tanto, el diseño de un tratamiento profiláctico para prevenir alergias en sujetos.

### 15 **Sumario de la invención**

En esta memoria se describen nuevos métodos para prevenir alergias en sujetos mamíferos mediante la administración epicutánea profiláctica de un alérgeno.

20 Se describe un método para prevenir alergias en un niño, en el que el método comprende la administración epicutánea de un alérgeno a dicho niño, siendo el alérgeno administrado al niño tras la detección de una reacción alérgica al mismo alérgeno o un alérgeno diferente.

En un aspecto adicional, se describe un método para prevenir la alergia en un niño que comprende administrar epicutáneamente a un niño al menos un alérgeno, en el que el niño es menor de 6 años y tiene una reacción alérgica detectada a al menos un alérgeno. El niño es preferiblemente un bebé o un niño pequeño.

25 En otro aspecto, se proporciona un método para prevenir la alergia en un niño, en el que el niño es alérgico a la leche o al ácaro del polvo doméstico y tiene menos de 6 años, y en el que el método comprende administrar epicutáneamente a dicho niño al menos una proteína de la leche o de ácaros del polvo doméstico. Como se describirá en la solicitud, dicha administración epicutánea previene el inicio o desarrollo de la alergia a otros alérgenos en dicho niño.

30 En un aspecto adicional, se proporciona un método para prevenir la alergia en un niño, comprendiendo el método detectar o verificar dicha primera reacción alérgica, administrando epicutáneamente a dicho niño al menos un alérgeno responsable de dicha primera reacción alérgica, protegiendo dicha administración epicutánea al niño del desarrollo de al menos una alergia adicional a otro alérgeno.

35 En otro aspecto, se propociona un método para proteger a un niño del desarrollo de alergias múltiples, comprendiendo el método detectar o verificar en un niño la ocurrencia de una reacción alérgica y, tras la detección o verificación de dicha reacción alérgica, administrar epicutáneamente a dicho niño al menos un alérgeno responsable de dicha reacción alérgica, induciendo dicha administración epicutánea una respuesta inmune en dicho niño que protege al niño del desarrollo de alergias múltiples.

40 También se describe una composición para usar en la prevención de alergias en un sujeto, en la que la composición comprende un alérgeno y se aplica epicutáneamente a un niño alérgico. Más preferiblemente, el niño es menor de 6 años, más preferiblemente el niño es un bebé o un niño pequeño. Aún más preferiblemente, el niño es alérgico a la leche o a los ácaros del polvo de la casa. Lo más preferiblemente, el niño es tratado después de la detección de su primera alergia.

45 Los métodos descritos más arriba se pueden usar para prevenir el desarrollo de alergias adicionales en los sujetos tratados, incluyendo alergias alimenticias, respiratorias o de contacto. Es especialmente adecuado para el tratamiento de bebés o niños pequeños que presentan un primer evento alérgico a un primer alérgeno, desensibilizan al niño frente al primer alérgeno y evitan el desarrollo de nuevas alergias a otros alérgenos diferentes.

La presente invención se refiere a una composición para su uso como se define en las reivindicaciones.

50 Más precisamente, la presente invención se refiere a una composición que comprende un alérgeno alimentario para uso en el tratamiento de un niño que tiene una alergia detectada a dicho alérgeno alimentario, para evitar que dicho niño desarrolle una alergia adicional a un alérgeno alimentario diferente, o a un alérgeno respiratorio, en el que la composición se administra epicutáneamente a dicho niño, protegiendo dicha administración al niño del desarrollo de al menos una alergia adicional al alérgeno alimenticio diferente o al alérgeno respiratorio.

**Leyendas de las figuras**

- 5      Figura 1: diseño del estudio. Se sensibilizaron ratones BALB/c a la leche y se dividieron en 2 grupos en los que uno fue tratado (EPIT) y el otro fue no tratado (simulado). El tratamiento se realizó durante 8 semanas. Después de este período, todos los ratones recibieron cacahuetes con el mismo protocolo habitualmente utilizado para sensibilizar a ratones frente al extracto de proteínas de cacahuete (PPE). Los ratones fueron entonces expuestos a cacahuetes durante 10 días. La inflamación del esófago se evaluó mediante la medición de la infiltración de eosinófilos en el esófago, determinada por la histología. También se investigaron respuestas serológicas y respuestas celulares.
- 10     Fig. 2: Respuestas específicas de IgE (Figura 2a) e IgG2 (Figura 2b) frente a la leche después de la sensibilización al día 43 (D43), durante EPIT el día 78 (D78) y al final del tratamiento, día 99 y día 127 (D99 y D127). Los resultados se expresan como media ± DE. \*\* p < 0,01.
- 15     Figura 3: Respuestas de IgE específica (Figura 3a) e IgG2 (Figura 3b) frente a PPE después de EPIT pero antes de ser expuestos a PPE (D99) y después de ser expuestos a PPE (D127). Los resultados se expresan como media ± DE. \* p <0,05, \*\*\* p <0,001.
- 20     Figura 4: Respuestas celulares de esplenocitos reactivados in vitro por leche (CMP) o PPE medido por IL-4 (Figura 4a) e IL-5 (Figura 4b). Los resultados se expresan como media ± DE. \* p <0,05.
- 25     Figura 5: Inducción de linfocitos T Foxp3 + CD25 + CD4 + (Treg) a partir de esplenocitos reactivados in vitro. Al final de los experimentos, se recogieron los esplenocitos y se reactivaron in vitro durante 3 días en presencia de leche (parte izquierda del gráfico) y PPE (parte derecha del gráfico). El porcentaje de Treg por el total de población de células T CD4 + se expresó como media ± SD. \* p <0,05, \*\* p <0,01.
- 30     Figura 6: Infiltración de eosinófilos en el esófago evaluada por análisis histológicos. Los resultados se expresan como media ± DE. \*\* p < 0,01.

**Descripción detallada de la invención**

35      Se describe un nuevo tratamiento profiláctico de alergias. Es especialmente adecuado para tratar a los niños que presentan una reacción alérgica frente a un alérgeno, para protegerlos contra el desarrollo de nuevas alergias frente a otros alérgenos diferentes. Es particularmente eficaz para tratar a niños pequeños que muestran una reacción alérgica frente a la leche o a ácaros del polvo doméstico, protegiendo así a los niños de desarrollar alergias adicionales frente a otros alérgenos. De hecho, los niños pequeños, tales como los bebés o niños infantiles, que desarrollan una reacción alérgica frente a un primer alérgeno, son muy susceptibles de convertirse en alérgicos frente a otras sustancias. La presente invención permite el tratamiento de tales sujetos alérgicos y reduce la aparición de otras alergias.

La presente descripción se entenderá mejor haciendo referencia a las siguientes definiciones:

**Definiciones**

35      "Administración epicutánea" se refiere a la aplicación de una sustancia (por ejemplo, un alérgeno) sobre la piel del sujeto bajo condiciones que permiten un contacto con la superficie de la piel. La aplicación de la piel se realiza preferiblemente sin ninguna perforación o pretratamiento de la piel. La aplicación de la piel se mantiene preferiblemente en condiciones que permiten la penetración del alérgeno en la(s) capa(s) superficial(es) de la piel y/o durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el contacto del alérgeno con las células inmunes. La administración epicutánea se realiza preferiblemente con un dispositivo para la piel, tal como un parche.

40      En el contexto de esta invención, se entiende que el término "prevenir" alergias incluye la protección del sujeto contra el desarrollo de alergias adicionales, previniendo la aparición de una sensibilidad frente a otros alérgenos, el retraso en la aparición o la ocurrencia de tal sensibilidad o alergia frente a otros alérgenos o inhibiendo o reduciendo la magnitud de cualquier reacción alérgica adicional.

45      Dentro del contexto de la presente invención, la expresión "piel intacta" indica que la integridad de la capa del estrato córneo debe ser sustancialmente mantenida. Para el funcionamiento de la invención, de hecho, es más preferido aplicar antígenos en la piel intacta (es decir, no pretratada), por ejemplo, sobre una superficie o porción de la piel donde la integridad del estrato córneo sea mantenida esencialmente. Mantener la integridad del estrato córneo y el estado de activación natural de los queratinocitos y las células de Langerhans, que se encuentran por debajo del estrato córneo, es importante para evitar una respuesta inmune Th2 sesgada. Manteniendo esta integridad, la respuesta obtenida está altamente orientada en el sentido de la tolerancia. Por consiguiente, aunque se pueda realizar una limpieza suave de la superficie de la piel en el lugar de aplicación, por ejemplo, una hidratación, limpieza con agua o una sola remoción muy suave, para eliminar, por ejemplo, corneocitos, la piel no debe ser tratada previamente, manteniendo así la integridad sustancial del estrato córneo. En particular, no se debe realizar una separación de esparadrappo o una abrasión fuerte de la piel, ya que tales pretratamientos alteran o eliminan todo o parte del estrato córneo y provocan la estimulación de los queratinocitos. De manera similar, se debe evitar la perforación del estrato córneo.

55

El término "alérgeno" se refiere a una molécula inmunológica implicada en una reacción alérgica. El alérgeno puede ser de naturaleza diversa, tal como un lípido, proteína, péptido, polipéptido, metal, plástico, etc. En una realización particular, el alérgeno es una proteína, polipéptido y/o péptido. El alérgeno puede estar en un estado natural, o ser producido artificialmente (por ejemplo, por técnicas recombinantes y/o enzimáticas, por ejemplo). El alérgeno puede ser estructuralmente alterado o modificado para mejorar su estabilidad, inmunogenicidad, etc. El alérgeno puede ser puro o estar mezclado con otros constituyentes. El alérgeno puede ser una mezcla de varias moléculas (por ejemplo, un extracto). Como se discutirá más adelante, el alérgeno puede usarse en diferentes estados, tales como en líquido o seco.

#### Métodos para prevenir alergias

Se describen composiciones y métodos para el tratamiento preventivo de alergias. En particular, los inventores han hecho el descubrimiento inesperado de que la administración epicutánea de un alérgeno puede inducir o estimular una respuesta inmune no alérgica específica en un sujeto, protegiendo así al sujeto del desarrollo de alergias adicionales frente a otros alérgenos diferentes. Mediante la aplicación de inmunoterapia epicutánea en sujetos con antecedentes alérgicos, es posible no sólo desensibilizar una alergia existente, sino que también prevenir el desarrollo de otras alergias. Como se describe en detalle a continuación, los experimentos de los inventores in vivo demuestran que la aplicación epicutánea de proteínas de leche a mamíferos alérgicos a la leche desensibiliza contra la leche y también protege frente a la exposición a otros alérgenos, incluyendo los cacahuets y los ácaros del polvo. Estos resultados son particularmente sorprendentes y notables puesto que, utilizando un alérgeno alimentario, es posible provocar una inmunidad protectora contra el desarrollo de alergias adicionales frente a otros alérgenos alimentarios así como alérgenos respiratorios o de contacto.

La invención es particularmente adecuada para proteger a los niños que exhiben una primera respuesta alérgica, que están en riesgo de desarrollar alergias adicionales. La invención es particularmente adecuada para tratar a niños pequeños, tales como bebés (0-1 años) y niños pequeños (1-3 años). Sin estar limitado por la teoría, los inventores creen que la reacción puede estar causada por una estimulación de la producción de células Treg por terapia epicutánea, lo que conduce a un mejor control de las células productoras de IgE y otras células inmunológicas alérgicas en el sujeto.

En un primer aspecto, se proporciona un método para prevenir alergias adicionales en un niño que tiene una reacción alérgica detectada, que comprende administrar epicutáneamente a dicho niño al menos un alérgeno, preferiblemente un alérgeno responsable de dicha reacción alérgica detectada.

Los inventores han descubierto que dicho efecto protector ocurre una vez que ha ocurrido al menos una primera reacción alérgica en un sujeto. Los resultados presentados en esta solicitud demuestran que la aplicación epicutánea de un alérgeno en dichos sujetos puede inducir o estimular Tregs. La capacidad para inducir Tregs epicutáneamente nunca antes se había descrito en la técnica. Los resultados presentados muestran además que Tregs son inducidos en estos sujetos cuando el alérgeno administrado epicutáneamente es un alérgeno responsable de la reacción alérgica detectada en el sujeto. Por lo tanto, es posible que la al menos una primera reacción alérgica (por ejemplo, una sensibilidad a un alérgeno) sea necesaria para inducir la producción de células Treg y que el tratamiento epicutáneo usando el alérgeno pueda amplificar esta población Treg actuando de este modo sobre la(s) respuesta(s) alérgica(s) correspondiente(s). El presente tratamiento permite la generación de una respuesta inmune no alérgica específica, que inhibe el desarrollo de alergias posteriores frente a nuevos alérgenos.

Por lo tanto, la invención es particularmente adecuada para tratar a niños, en particular a niños menores de 6 años. En estos niños, el sistema inmunológico no ha sido expuesto todavía a múltiples alérgenos. En particular, los alérgenos alimentarios son todavía limitados en estos niños. Por consiguiente, tras la detección de una primera reacción alérgica, el tratamiento epicutáneo preventivo de la invención es particularmente eficaz. Además, debido a que las alergias pueden desarrollarse temprano, al tratar a estos niños es posible prevenir el desarrollo de múltiples alergias.

Por lo tanto, el tratamiento se aplica preferiblemente a niños menores de 6 años que presentan una respuesta alérgica. La invención es particularmente adecuada para tratar a bebés y niños pequeños. La respuesta alérgica detectada en dichos niños es típicamente una alergia a la leche. Por consiguiente, el método es particularmente adecuado para tratar a niños menores de 6 años que tienen una alergia a la leche. Al administrar epicutáneamente a estos sujetos una cantidad profiláctica de un alérgeno de la leche, es posible proteger eficazmente a los niños contra el desarrollo de nuevas alergias.

Se prefiere realizar el tratamiento poco después de la detección o verificación de la presencia de una reacción alérgica en el sujeto. De hecho, actuando de manera temprana (es decir, antes de que el sujeto haya estado expuesto a múltiples alérgenos), es posible inducir una respuesta inmune fuerte y potente que se espera que impida el desarrollo de una amplia gama de alergias. A este respecto, es más preferible tratar a los niños tras la detección o verificación de una primera reacción alérgica, de manera que se puede contemplar un efecto protector contra todos los demás alérgenos.

En una realización preferida, el alérgeno se administra antes de la detección de una segunda reacción alérgica frente a un segundo alérgeno en el niño tratado. La detección o verificación de una reacción alérgica se puede llevar a cabo usando técnicas en sí conocidas en la técnica. Ejemplos de métodos adecuados incluyen el uso de una prueba de pinchazo, la dosificación de IgE, o un ensayo de parche de atopía. La detección de una reacción alérgica incluye la detección de una sensibilidad frente a un alérgeno, incluso si no hay signos clínicos de la alergia que están presentes. Generalmente, la detección viene primero de la aparición de síntomas clásicos alérgicos (inflamación, deglución, etc). Puede entonces ser probado de nuevo, o verificado, por ejemplo, por un médico, usando cualquiera de las técnicas anteriores, si es necesario. Una vez que se ha detectado o verificado una reacción alérgica para un sujeto, puede iniciarse el tratamiento de la invención. La eficacia del tratamiento aumentará si el tratamiento se inicia en breve (por ejemplo, inmediatamente o dentro de semanas, por ejemplo menos de 4 semanas) después de la detección o verificación de la respuesta alérgica. De hecho, al actuar temprano, se genera un efecto preventivo hacia cualquier otra alergia. Para ello, es mejor que el tratamiento se realice tras la detección de la primera respuesta alérgica en el sujeto y antes de la detección de una alergia adicional (por ejemplo, antes de la aparición de IgE detectable específica para un segundo alérgeno en dicho niño). Sin embargo, el tratamiento también es potente en sujetos que muestran varias reacciones alérgicas, ya que todavía puede generar una protección general contra alergias adicionales.

Por lo tanto, el método es particularmente eficaz para tratar a los bebés (menores de 1 año) o a los niños pequeños (de 1 año a 3 años) que tienen una primera reacción alérgica.

En una realización preferida, el método es para el tratamiento de niños menores de 6 años que tienen una reacción alérgica detectada frente a la leche.

En cierto aspecto, se proporciona un método que comprende la aplicación epicutánea de al menos un alérgeno al sujeto. Más preferiblemente, al menos un alérgeno aplicado es un alérgeno responsable de la reacción alérgica detectada en el sujeto. De hecho, utilizando un alérgeno de este tipo, se obtiene un efecto protector y el sujeto también puede ser desensibilizado frente al alérgeno. Además, los inventores han mostrado sorprendentemente que el alérgeno causante es capaz de inducir Tregs en el sujeto, mientras que los alérgenos no relacionados no pueden.

Un alérgeno "responsable" de la reacción alérgica detectada (o un alérgeno "causante") designa cualquier alérgeno derivado de la sustancia a la que el sujeto es alérgico. El alérgeno puede ser un componente de la sustancia alérgica (por ejemplo, una proteína de la leche), o un fragmento de tal componente (por ejemplo, un fragmento de una proteína) que tiene epítipo(s) inmunogénico(s). Como se ha indicado anteriormente, el alérgeno puede ser un extracto entero, una mezcla purificada, un inmunógeno aislado, etc.

En una realización de la invención, la reacción alérgica detectada es una alergia a la leche y el alérgeno administrado comprende una proteína de leche o un fragmento de la misma que tiene epítipo(s) inmunogénico(s).

También se describe un método en el que la reacción alérgica detectada es una alergia a los ácaros del polvo doméstico y que el alérgeno administrado comprende una proteína del ácaro del polvo doméstico o un fragmento del mismo que tiene epítipo(s) inmunogénico(s).

El protocolo de tratamiento epicutáneo puede ser ajustado por el médico. Típicamente, el alérgeno se aplica repetidamente (es decir, varias veces), durante un período de tiempo suficiente para causar una respuesta inmune protectora. En una realización preferida, el tratamiento se realiza durante un período de al menos 3 meses, preferiblemente al menos 6 meses, y más preferiblemente entre 6 y 36 meses. Durante este período de tratamiento, el alérgeno puede administrarse a diversas frecuencias, tales como semanalmente, cada dos días o diariamente. La dosis de alérgeno utilizada para cada aplicación puede ser ajustada por el experto en la técnica. Típicamente, puede comprender entre 0,1 y 10000 µg, preferiblemente entre 20 y 1000 µg. La inmunidad protectora en el sujeto puede ser verificada en cualquier momento por examen convencional. En particular, la existencia de una respuesta inmunitaria protectora en los sujetos tratados puede ser verificada por una disminución o desaparición o ausencia de signos clínicos de alergia, tales como trastornos digestivos, signos cutáneos (por ej. eccema o atopía dermatológica), rinitis, o asma. También puede realizarse la dosificación de células inmunes o mediadores (tales como IgE) en el sujeto, aunque la ausencia de signos clínicos es suficiente. Una vez que se ha generado la inmunidad protectora, es posible reducir el tratamiento (dosis, frecuencia de aplicación, tiempo de aplicación), o incluso detenerlo. Como se indicó anteriormente, el tratamiento se mantiene típicamente durante un período de tiempo de al menos 3 meses, con aplicaciones repetidas a intervalos diferentes.

En una realización preferida, el alérgeno se aplica sin adyuvante. Sin embargo, aunque no se prefiera, el alérgeno puede combinarse con un adyuvante, es decir, cualquier sustancia que, por ejemplo, active o acelere el sistema inmunitario para provocar una respuesta inmune mejorada. Ejemplos de adyuvantes incluyen sales minerales, tales como fosfato de calcio, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio; ADN o ARN inmunoestimulador, tales como oligonucleótidos CpG; proteínas, tales como anticuerpos o proteínas de unión al receptor de tipo Toll; saponinas, p. ej. QS21; citoquinas; derivados muramil dipéptidos; LPS; MPL y derivados incluyendo 3D-MPL; GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos); imiquimod; partículas coloidales; adyuvante de Freund completo o incompleto; adyuvante de Ribi o la toxina bacteriana, p. ej., la toxina del cólera o enterotoxina (LT).

En una realización preferida adicional, el alérgeno se aplica sobre una zona intacta de la piel.

Se prefiere particularmente aplicar el alérgeno sin adyuvante y en la piel intacta.

El alérgeno se puede aplicar usando diferentes técnicas o dispositivos adecuados para mantener el contacto entre el alérgeno y la piel del sujeto. Dichos dispositivos incluyen, sin limitación, un parche, una cinta, un apósito, una hoja o cualquier otra forma conocida por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el dispositivo de piel es un parche, incluso más preferiblemente un parche oclusivo. Los dispositivos de parche preferidos no alteran la integridad de la piel, es decir, no son perforantes. En la realización más preferida, el método de la invención utiliza un dispositivo de parche de piel como se describe en las solicitudes de patente internacionales WO2002/071950 y WO 2007/122226. Dicho dispositivo es oclusivo y está configurado para usar un alérgeno en forma seca, manteniéndose el alérgeno en el parche a través de fuerzas electrostáticas y/o de Van der Waals, sin la adición del adhesivo. La preparación y las características de tal dispositivo (denominado Viaskin®) se describen en detalle en las solicitudes identificadas anteriormente, que se incorporan en este documento como referencia en su totalidad.

Para el funcionamiento de la presente invención, resulta particularmente adecuado utilizar un dispositivo que comprende un soporte adaptado para crear con la piel una cámara herméticamente cerrada, teniendo este soporte, en su cara enfrentada a la piel dentro de la cámara, el antígeno seco adherido a través de fuerzas electrostáticas y/o fuerzas de Van der Waals. Tras la aplicación a la piel, la humedad aumenta en la cámara, dando lugar a la disolución del alérgeno y el contacto con la piel.

En otra realización preferida de la invención, el antígeno se aplica sobre la piel del sujeto usando un dispositivo de parche oclusivo que comprende un soporte al que está unido el alérgeno. Preferentemente, el alérgeno está unido al soporte del parche a través de fuerzas electrostáticas o de Van der Waals, sin la adición del adhesivo. En realizaciones particulares, el soporte del parche puede comprender vidrio o un polímero seleccionado del grupo que consiste en plásticos celulósicos (CA, CP), cloruro de polivinilo (PVC), polipropileno, poliestireno, poliuretano, policarbonato, poliacrílico, poliolefinas, poliésteres, polietileno y acrilatos de etileno-vinilo (EVA). El parche puede estar asegurado a la piel por un borde adhesivo.

En una realización más preferida, el método se lleva a cabo usando una preparación alérgica seca, que se aplica preferiblemente sobre la piel usando un dispositivo de piel electrostática. A este respecto, el término "seco" designa el hecho de que el alérgeno está sustancialmente en polvo, por ejemplo, en forma de partículas que pueden individualizarse o aglomerarse.

Aunque menos preferido, el alérgeno puede estar en forma líquida y ser aplicado usando dispositivos conocidos, tales como dispositivos oclusivos que tienen un depósito o una membrana perforada.

Según un aspecto de la invención el método de la invención comprende administrar epicutáneamente, a un niño menor de 6 años que tiene una reacción alérgica detectada a la leche, al menos una proteína de la leche, previniendo dicha administración epicutánea el inicio de la alergia a dichos otros alérgenos en dicho niño.

Según un aspecto adicional, también se describe un método para proteger a un niño del desarrollo de alergias múltiples, comprendiendo el método la detección o verificación en un niño de la aparición de una primera reacción alérgica y, tras la detección de dicha primera reacción alérgica, la administración epicutánea a dicho niño de un alérgeno responsable de dicha primera reacción alérgica, induciendo dicha administración epicutánea una respuesta inmune en dicho niño que protege al niño del desarrollo de alergias múltiples.

Se describe una composición para uso para prevenir la alergia en un sujeto, en donde la composición comprende un alérgeno y se aplica epicutáneamente a un niño que tiene una reacción alérgica detectada. Más preferiblemente, el niño es menor de 6 años. Aún más preferiblemente, el niño es alérgico a la leche o a los ácaros del polvo doméstico. Lo más preferiblemente, el niño es tratado después de la detección de su primera alergia.

En otro aspecto, se proporciona un método para inducir Tregs en un sujeto alérgico, comprendiendo el método la aplicación epicutánea al sujeto de un alérgeno causante.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en la siguiente sección experimental, que debe considerarse como ilustrativa.

## Ejemplos

### Métodos

#### Ratones

En el estudio se utilizaron ratones BALB/c hembra de tres semanas de edad (Charles River Laboratories, Francia). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas comunitarias de cuidado de los animales.

#### Protocolo de sensibilización a la leche

Se sensibilizaron ratones BALB/c de tres semanas de edad a la leche al recibir 6 administraciones intragástricas semanales de leche mezclada con 10 µg de toxina de cólera como adyuvante. Los sueros se recogieron a partir del plexo venoso retro-orbital antes y al final del periodo de sensibilización. A los ratones sin tratamiento previo se les extrajo sangre en los mismos días.

#### 5 Protocolo de inmunoterapia epicutánea a la leche

Se realizó inmunoterapia epicutánea (EPIT) una vez a la semana durante 8 semanas consecutivas. En primer lugar, los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con ketamina y xilazina y se afeitaron con una afeitadora eléctrica y crema depilatoria. Al día siguiente se colocaron 100 µg de proteínas de leche en la espalda y se mantuvieron con un vendaje adhesivo durante 48 horas.

#### 10 Protocolo de sensibilización a los cacahuetes

Dos semanas después del final de la inmunoterapia epicutánea, los ratones se sometieron a un programa de sensibilización de cacahuetes validado mediante la administración de una sola dosis (80 mg) de proteínas de cacahuete por vía oral. Los ratones control (no sensibilizados a la leche, no tratados con leche) fueron sometidos al mismo programa de sensibilización del cacahuete como un control positivo. Los ratones sin tratamiento previo se incluyeron como controles negativos.

#### Exposición oral sostenida del cacahuete

Los cacahuetes fueron reintroducidos en su régimen. Éste consistía en la alimentación exclusiva con cacahuetes en lugar de comida estándar de ratón durante 4 días consecutivos. Los animales recibieron entonces cacahuetes mezclados en alimento estándar durante los 6 días siguientes y administración intragástrica diaria de una solución que contenía 10 mg de proteína de cacahuete durante los últimos 3 días de esta segunda fase. Al final, los ratones fueron sacrificados después de una anestesia profunda y se tomaron muestras para examinar la histología del esófago, la expresión de ARNm de citoquinas en la mucosa esofágica y las citoquinas secretadas por esplenocitos reactivados. También se tomaron muestras de sangre para medir las respuestas serológicas frente a los cacahuetes.

#### 25 Ensayo de IgE, IgG1 e IgG2a específicas en muestras de plasma

Se recogieron muestras de sangre bajo anestesia a partir del plexo venoso retro-orbital y las muestras de plasma se almacenaron a -20°C hasta nuevos análisis. Los anticuerpos específicos se determinaron usando un ELISA cuantitativo, que se ha desarrollado internamente. Brevemente, las placas de microtitulación se revistieron con 100 µl por pocillo de materiales alergénicos de la leche o del cacahuete a una concentración de proteína de 5 µg/ml. Se distribuyeron diluciones en serie de 50 µl de cada suero por pocillo y se incubaron durante 24 h a + 4 °C. Se utilizó como marcador un anticuerpo IgE, IgG1 o IgG2a anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina (Serotec, Oxford, Inglaterra). Se utilizó fosfato de para-nitrofenilo (pNPP - Sigma, Francia) como sustrato enzimático. Las IgE, IgG1 e IgG2a específicas se cuantificaron por comparación con curvas de concentración-respuesta obtenidas con un ensayo de IgE, IgG1 o IgG2a total realizado en condiciones idénticas utilizando una fase sólida recubierta con un anticuerpo IgE, IgG1 o IgG2a anti-ratón (Serotec, Oxford, Inglaterra), que es complementaria al marcador, en lugar de proteínas alergénicas. Los patrones de inmunoglobulina de ratón se obtuvieron de Serotec (Oxford, Inglaterra).

#### Respuestas celulares

Después del sacrificio de ratones, los bazos se agitaron en una suspensión de células individuales y se lavaron tres veces en RPMI-1640 (Gibco, Francia). Las células se contaron y se ajustaron a una densidad de cultivo de  $4 \times 10^6$  células/ml y se colocaron suspensiones celulares de 500 µl en cada pocillo de una placa de microtitulación de 24 pocillos (Nunc) junto con medio de 500 µl o leche o PPE (100 µg/ml). Después de 72 horas, se recogieron los sobrenadantes y se analizó la presencia de citoquinas usando BioPlex cytokine Assay (BioRad, marnes-la-Coquette, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El recuento celular y la tinción de CD4, CD25 y Foxp3 se realizaron usando anticuerpos específicos (BD Pharmingen). La adquisición se realizó en el citómetro Canto II mediante la adquisición de 5000 eventos en una puerta FSC<sup>lo</sup>/SSC<sup>lo</sup> predefinida. El porcentaje de células CD25 y Foxp3 positivas dentro de la población de CD4+ se evaluó a continuación utilizando el software Flow Jo.

#### Resultados

##### Respuestas serológicas (figuras 2 y 3)

La sensibilización a la leche se realizó desde el día 1 hasta el día 43, y seguido por el tratamiento con EPIT de leche (véase el protocolo de la Fig. 1).

Como se muestra en la Fig. 2a, la sensibilización a la leche se marca en ratones mediante una producción de IgE específica (fig. 2a: día 43).

En ratones sensibilizados con leche, el tratamiento EPIT de la leche (fig. 2a: del día 44 al día 127) indujo:

- En primer lugar, un aumento de la IgE específica (fig. 2a: del día 78 al día 98) durante el período de 8 semanas de tratamiento,

- luego una disminución de la IgE específica (fig 2a: del día 99 al día 127) un mes después del final del EPIT, como se observó en estudios clínicos;

5 • eventualmente, un aumento significativo (fig. 2b: de D78 a D127) de IgG2a específica, un marcador biológico Th1. El día 127, la tasa alcanzada de IgG2a específica sobre IgE específica mostró una modificación de la respuesta inmune de un perfil Th2 a un perfil Th1 más marcado, firmando así la eficacia EPIT.

10 Durante la segunda fase del protocolo, los ratones fueron expuestos a PPE. Los resultados muestran que, entre los ratones expuestos al cacahuete al día 99 (protocolo de sensibilización al cacahuete), sólo los ratones tratados simuladamente y los ratones control exhiben un aumento de la IgE específica a los cacahuetes (figura 3a). Por el contrario, en ratones previamente tratados por inmunoterapia epicutánea de leche, se observó un aumento significativo en la IgG2a específica a los cacahuetes (figura 3b), lo cual es característico de una respuesta tolerante a los cacahuetes. Estos resultados muestran que el tratamiento EPIT de la leche protegió a los ratones de la posterior alergia al EPP.

15 Respuesta celular (figuras 4 y 5)

i) Citoquinas (figura 4)

La Figura 4 muestra respuestas celulares de esplenocitos reactivados in vitro por la proteína de la leche de vaca (CMP) o por el extracto de proteína de cacahuete (PPE) medido por IL-4 (figura 4a) e IL-5 (figura 4b). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE.

20 Figura 4-parte izquierda y figura 4b-parte izquierda: La reactivación in vitro de los esplenocitos del grupo simulado fue marcada por una producción de IL-4 e IL-5, que son citocinas Th2, en comparación con el control y EPIT ( $p < 0,05$ ). Este fenómeno marca un efecto de protección del EPIT aplicado a los ratones EPIT de leche.

25 Figura 5-parte derecha y figura 5b-parte derecha (efecto del protocolo de exposición de la proteína del cacahuete en los grupos EPIT/simulado/control): exposición a cacahuetes en ratones simulados tratados sensibilizados con leche y los ratones control se marcaron por una alta producción de IL-4 e IL-5, que son citocinas Th2, en comparación con los ratones tratados con EPIT sensibilizados con leche ( $p < 0,05$ ). Este fenómeno marca un efecto de protección global del EPIT aplicado a ratones sensibilizados con proteína de leche.

ii) Treg (figura 5)

La inducción específica de células Treg se analizó después de:

30 - Sensibilización (figura 5-leche - parte izquierda),

- Leche EPIT (figura 5-leche / - parte derecha),

- Exposición de PPE en ratones simulados (figura 5 - PPE - parte izquierda),

- Exposición de PPE en ratones tratados con EPIT de leche (figura 5 - PPE - parte derecha).

35 Los resultados de los inventores muestran que, en el grupo EPIT tratado con leche, se induce un alto nivel de células Treg ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) después de la sensibilización a la leche. Esta población de Treg es inducida específicamente por inmunoterapia. Por el contrario, el número de células Treg no aumentó por reactivación in vitro en presencia de PPE. Sin estar limitado por la teoría, parece probable que la presencia de células Treg inducidas específicamente por EPIT-leche (figura 5-leche / parte derecha) dirige la respuesta inmune al PPE hacia un perfil tolerante sin producción de citocinas Th2.

40 Infiltración de eosinófilos en el esófago (figura 6)

La exposición sostenida del cacahuete oral a los cacahuetes provoca principalmente al esófago e induce una alta infiltración de eosinófilos para los ratones sensibilizados a los cacahuetes (control, figura 6).

Se observó una mayor infiltración de eosinófilos en ratones sensibilizados y no tratados con leche, y luego expuestos a cacahuetes con el protocolo de sensibilización del PPE (figura 6).

45 Cuando los ratones sensibilizados y tratados con EPIT a la leche fueron expuestos a cacahuetes para inducir la inflamación del esófago, no se observó infiltración eosinofílica en el esófago (EPIT, figura 6), a un nivel similar al de los ratones no tratados (ratones no sensibilizados a la leche y a los cacahuetes: no tratados, figura 6).

Discusión

- Este estudio ha mostrado sorprendentemente in vivo que una desensibilización temprana a la leche influye significativamente en la respuesta inmune a otros alérgenos. Esta es la primera demostración de un efecto preventivo sobre la alergia causada por la terapia epicutánea. De hecho, el tratamiento EPIT frente a la leche indujo una producción específica de células T reguladoras (Treg). La inducción de la tolerancia a la leche a través de Treg evitó la sensibilización frente a otros alérgenos, tales como los cacahuets o HDM. Se demostró que después de un proceso de desensibilización eficaz a la leche por EPIT, los animales tratados fueron protegidos de la sensibilización frente a PPE y se obtuvo una respuesta tolerante con una alta producción de IgG2a específica y bajos niveles de citocinas Th2 secretadas por esplenocitos reactivados. Además, el protocolo de desensibilización al cacahuete indujo una muy baja infiltración eosinofílica en el esófago.
- 5
- 10
- Estos resultados demuestran, por lo tanto, que el tratamiento EPIT puede inducir una protección eficaz contra alergias adicionales en sujetos.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende un alérgeno alimentario para su uso en el tratamiento de un niño que tiene una alergia detectada a dicho alérgeno alimentario, para evitar que dicho niño desarrolle una alergia adicional a un alérgeno alimentario diferente o a un alérgeno respiratorio, en donde la composición se administra epicutáneamente a dicho niño, protegiendo dicha administración al niño del desarrollo de al menos una alergia adicional al alérgeno alimentario diferente o al alérgeno respiratorio.
2. La composición para su uso de la reivindicación 1, en la que el niño es un bebé o un niño pequeño.
- 10 3. La composición para su uso de la reivindicación 1 ó 2, en la que la alergia detectada es la primera alergia detectada en dicho niño y en la que el alérgeno se administra después de la detección o verificación de dicha primera reacción alérgica.
4. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la alergia detectada es una alergia a la leche o al cacahuete.
5. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el alérgeno se aplica repetidamente.
- 15 6. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el alérgeno se aplica en ausencia de adyuvante.
7. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el alérgeno se aplica sobre una zona intacta de la piel.
- 20 8. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el alérgeno se aplica utilizando un dispositivo de parche oclusivo no invasivo.
9. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el alérgeno se aplica repetidamente durante un periodo de 3 a 36 meses.
10. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para proteger a dicho niño del desarrollo de alergias múltiples.

25

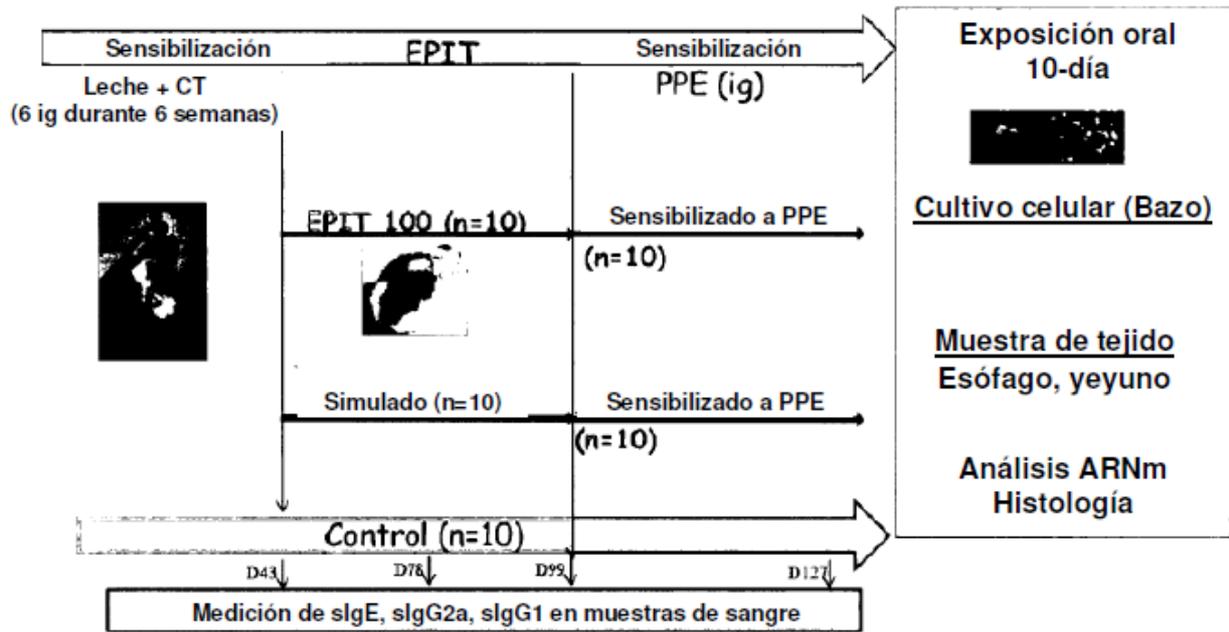


Figura 1

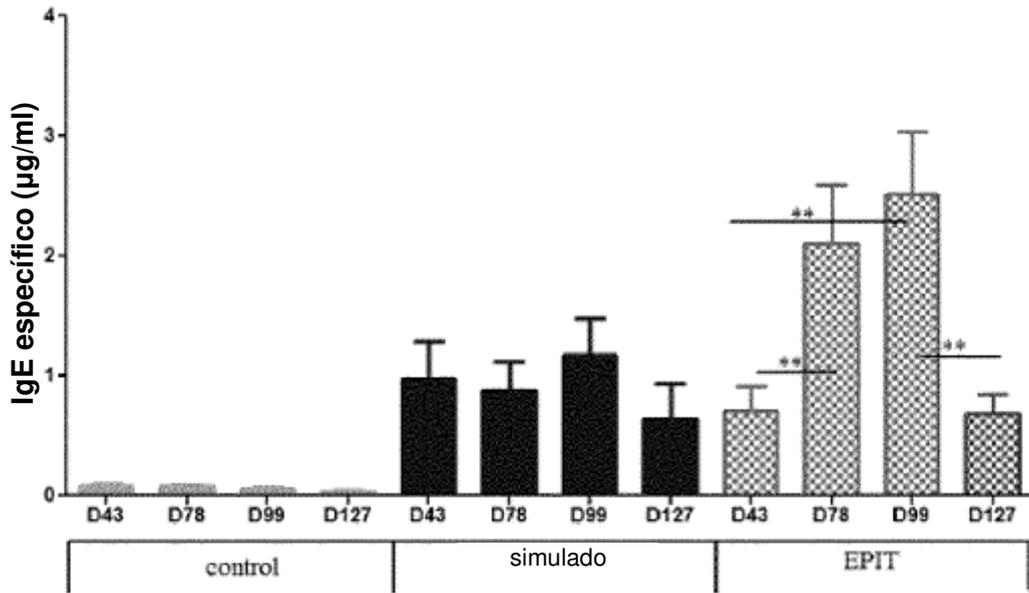


Figura 2-a

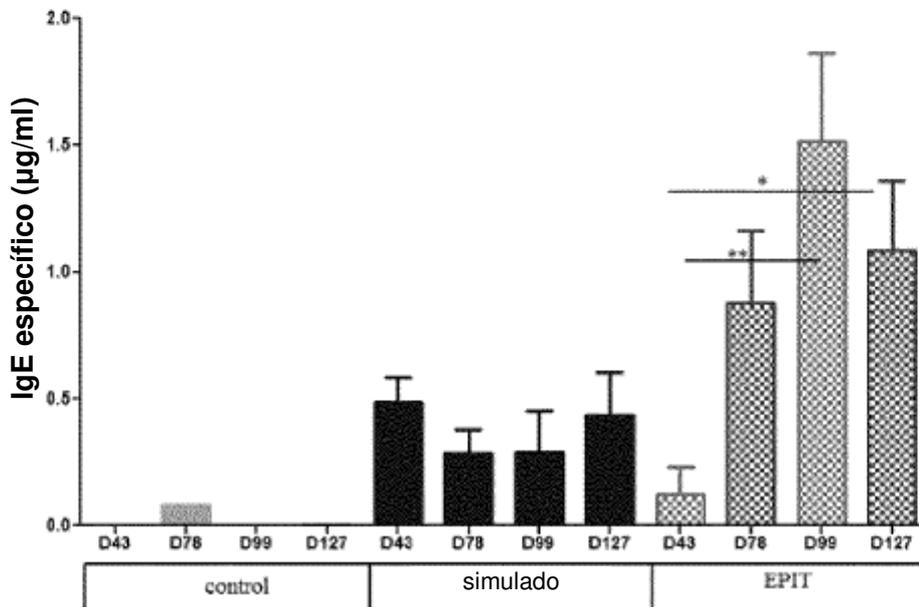


Figura 2-b

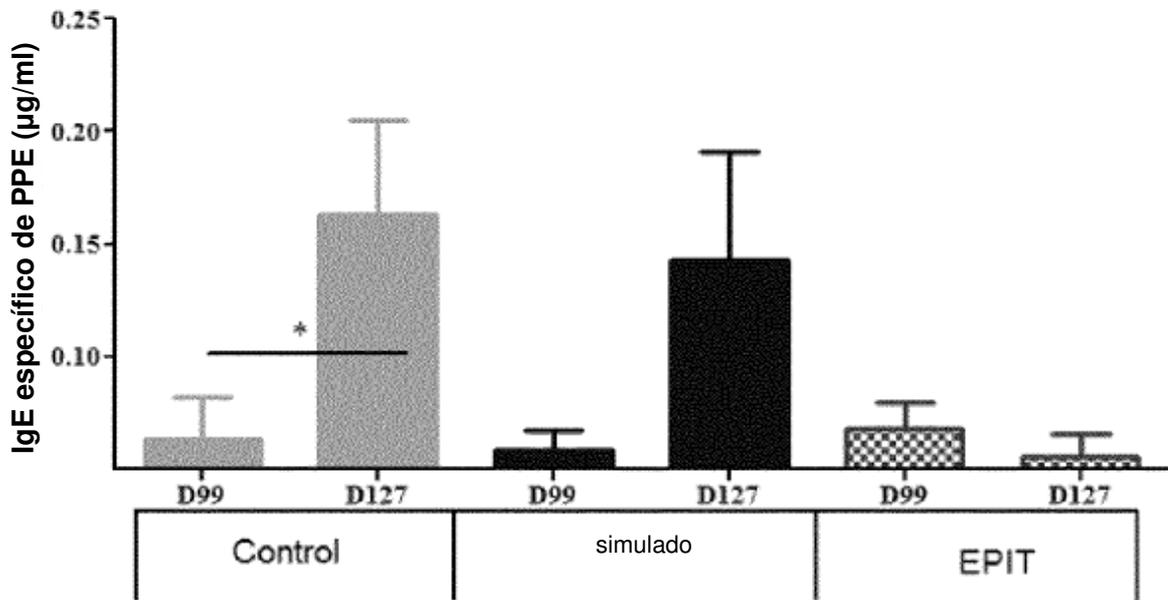


Figura 3-a

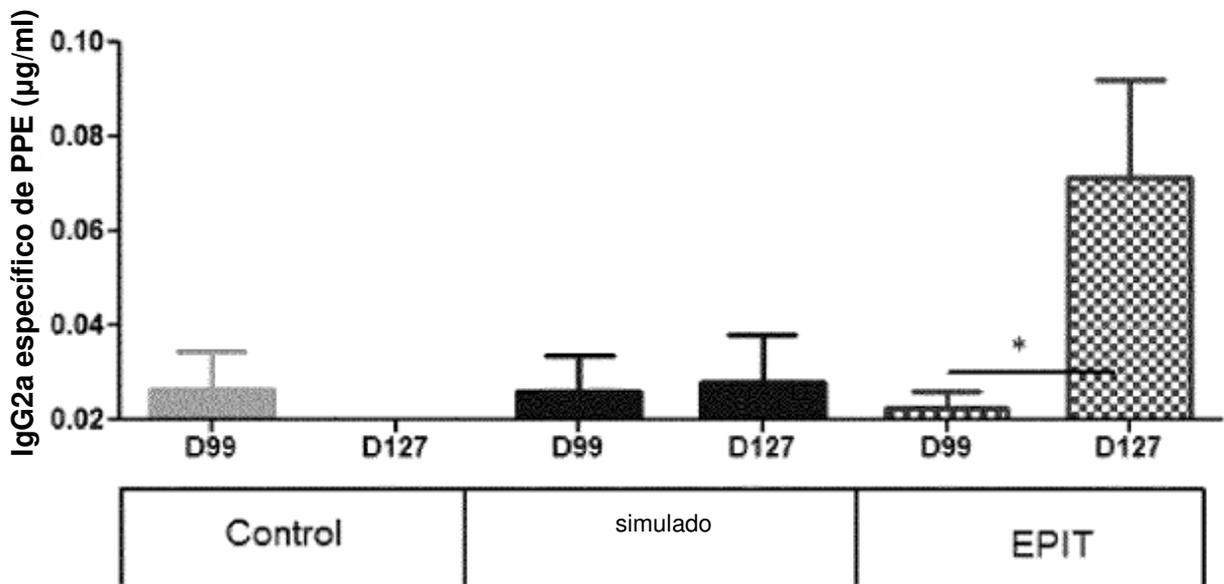


Figura 3-b

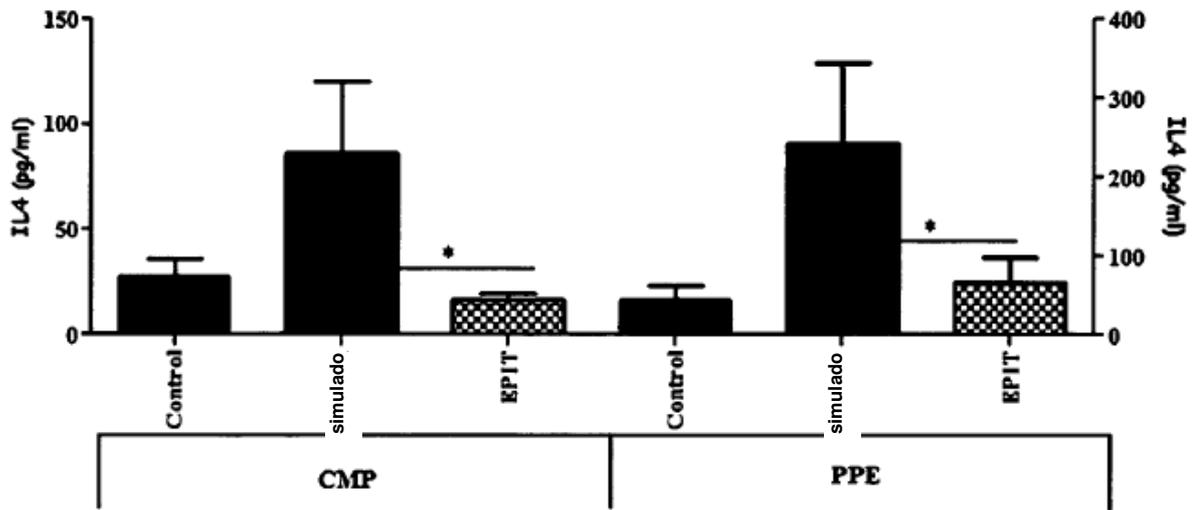


Figura 4-a

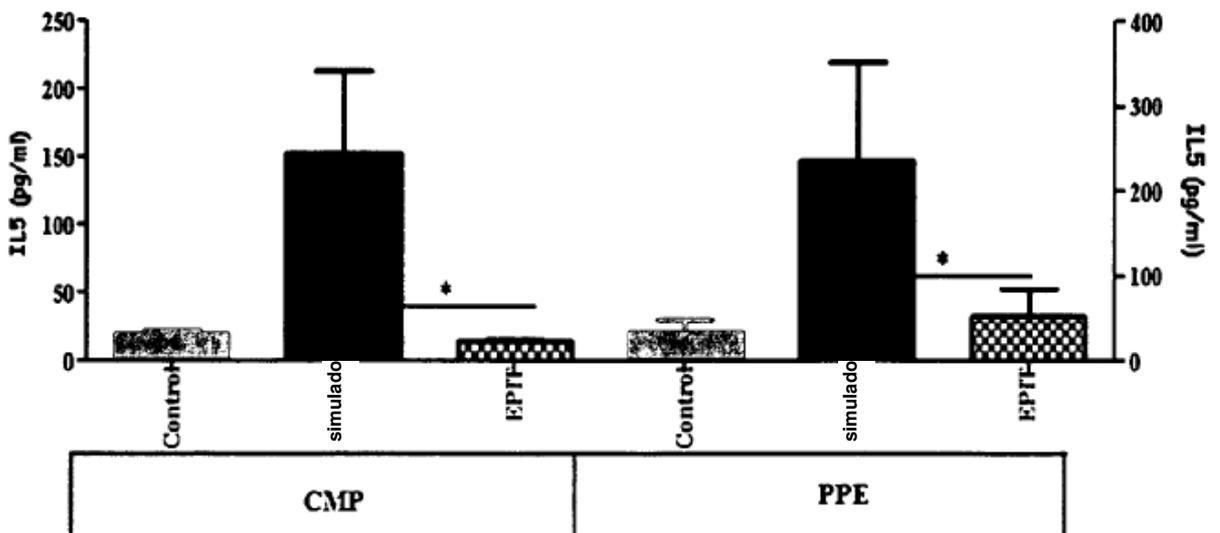


Figura 4-b

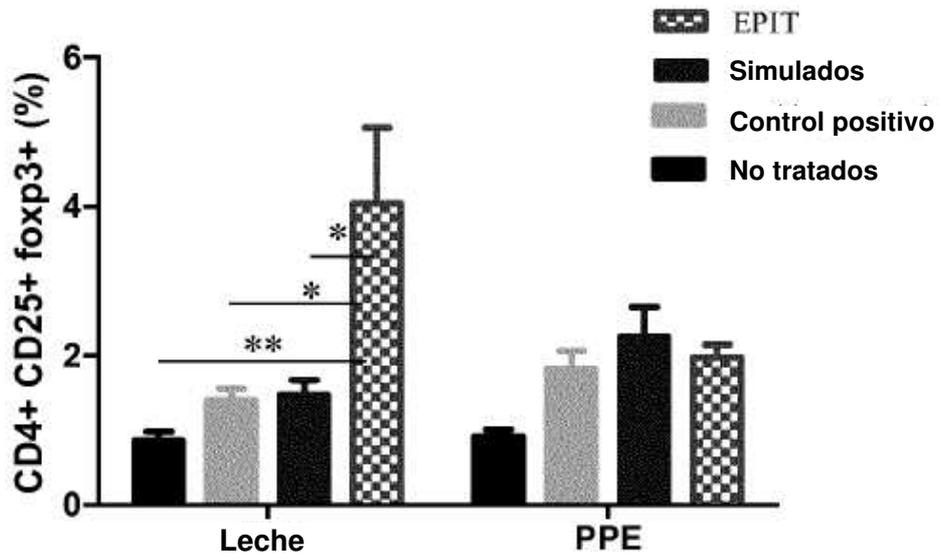


Figura 5

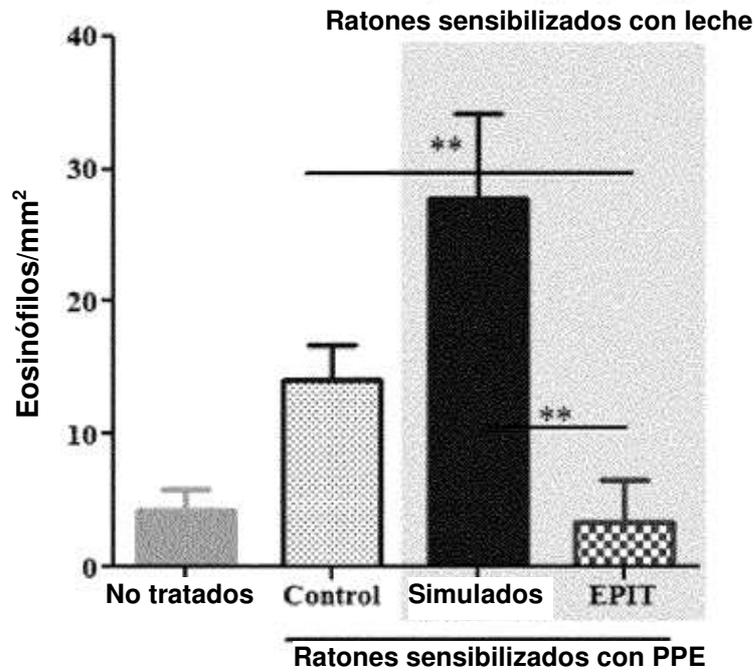


Figura 6